АКАДЕМИЯ НАУК СОЮЗА ССР

# МИКРОБИОЛОГИЯ

ЖУРНАЛ ОБЩЕЙ, СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ
И ПРОМЫШЛЕННОЙ МИКРОБИОЛОГИИ

ТОМ XVII. ВЫП. 3

МАЙ—ИЮНЬ

ИЗДАТЕЛЬСТВО АКАДЕМИИ НАУК СССР
МОСКВА

1948

**МИКРОБИОЛОГИЯ**

Редактор академик Б. Л. Исаченко

Зам. редактора чл.-корр. Академии Наук СССР
А. А. Имшенецкий

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

А. Ф. Войткевич, Я. И. Раутенштейн, В. Л. Рыжков,

Ф. М. Чистяков, В. Н. Шапошников

*ПО ВСЕМ ВОПРОСАМ ПОДПИСКИ НА ЖУРНАЛ „МИКРОБИОЛОГИЯ"
ОБРАЩАТЬСЯ ПО АДРЕСУ: МОСКВА, Б. ЧЕРКАССКИЙ ПЕР., 2,
КОНТОРА „АКАДЕМКНИГА".*

---

Рукописи направлять по адресу:
Москва, Волхонка, 14, Издательство Академии Наук СССР,
редакции журнала „Микробиология"

# ОБ ОДНОМ ПРОЯВЛЕНИИ АНТИМИКРОБНЫХ СВОЙСТВ ПОЧВЫ

*Д. М. Новогрудский*

В настоящей статье излагаются исследования о еще мало известной способности почвы подавлять и полностью угнетать развитие микроорганизмов. Эти свойства почвы мы называем антимикробными.

## I

Поводом для этих исследований послужило следующее наблюдение, многократно повторенное в различных модификациях. Откапывают растение пшеницы или ячменя и отбирают несколько узловых корешков: одни — по возможности голые, свободные от частичек почвы; другие — с приставшими к их поверхности многочисленными почвенными частицами. Те и другие помещают на фильтровальную бумагу во влажную камеру. После некоторого времени корешки, не защищенные почвенными частицами, становятся ареной развития грибов и актиномицетов и постепенно разлагаются. В противоположность этому на корешках, покрытых почвенными частицами, в течение длительного времени упомянутые микроорганизмы не развиваются и внешне заметных изменений корешков не наблюдается. Такой же результат получают, если брать не живые корешки, а отмершие. Из этих простых наблюдений следует, что покрывающие поверхность корешков частички почвы обладают способностью задерживать развитие находящихся на них грибов и актиномицетов.

К этой же категории явлений относится другое наблюдение. В одну чашку Петри со стерильной агаризованной водой высевают 50 мг почвенного мелкозема (частиц поперечником $< 0{,}25$ мм); другую такую же чашку оставляют незасеянной. Обе чашки оставляют открытыми на 10—20 минут, после чего их прикрывают и помещают в термостат при 25°. Через некоторое время в чашке без почвенных частиц появляются колонии грибов, актиномицетов и бактерий, зародыши которых попали из воздуха на поверхность агаризованной воды. В другой чашке с частичками почвы колонии этих организмов отсутствуют, несмотря на то, что в промежутках между частичками почвы достаточно пространства для их развития. Как объяснить подобный результат? «Загрязнения» из воздуха должны попадать на обе агаризованные пластинки, а обнаруживаются они только на одной. Приходится допустить, что находящиеся на поверхности агаризованной воды частички почвы обладают способностью задерживать развитие микроорганизмов из воздуха, не приспособленных к жизни в условиях почвы.

Об антимикробных свойствах почвы говорит и такой опыт. На пластинку агаризованной воды высевают 50 мг почвенного мелкозема таким образом, чтобы на одной половине пластинки почвенные частицы были расположены возможно гуще, а на другой — очень редко. Через несколько дней вокруг частичек почвы развиваются микроскопических размеров колонии грибов и актиномицетов. Исследуя чашку под малым увеличением микроскопа, убеждаются, что в той половине агаровой пластинки, где частички почвы расположены густо, т. е. на близком расстоянии друг от друга, колонии грибов и актиномицетов встречаются реже и размеры их меньше, чем на другой половине той же пластинки,

где частички почвы расположены редко, на большом расстоянии друг от друга. Этот результат не может быть объяснен недостатком питательных веществ на первой половине пластинки. Вместе с частичками почвы их вносится достаточно для развития микроскопических колоний грибов и актиномицетов. Остается поэтому допустить, что способность почвенных частиц подавлять развитие грибов и актиномицетов проявляется при густом расположении этих частиц и мало или совсем не проявляется при их редком расположении.

Приведенные наблюдения показывают, что частички почвы, расположенные достаточно близко одна от другой, обладают антимикробными свойствами. Изучение последних составляет предмет настоящего исследования.

## II

Первая задача заключалась в том, чтобы установить способ количественной характеристики антимикробного действия почвенных частиц и выяснить, какая часть почвенного мелкозема обладает антимикробными свойствами — крупные частички почвы или мелкие.

Опыты проводились с образцами следующих почв:

№ 141. Темнокаштановая; глинистая. Гор. А. Гумуса 4,19%, физической глины 68,2%;

№ 152. Темнокаштановая; солонцеватая. Гор. А. Гумуса 3,87%, физической глины 71,2%.

№ 152а. Та же почва. Гор. В. Гумуса 2,47%, физической глины 65,3%.

№ 178. Солонец-солончак. Гор. А. Гумуса 9,68%, физической глины 63,5%.

Из каждого почвенного образца выделены при помощи сит следующие три фракции: 1) 0,5—0,25 мм, 2) 0,25—0,125 мм, 3) $<$ 0,125 мм. Каждая фракция высеяна на разлитую в чашки Петри агаризованную воду в трех навесках: а) 10 мг, б) 50 мг и в) 250 мг, из которых каждая последующая больше предыдущей в 5 раз. После инкубации при 20—22° производился подсчет количества активных почвенных частиц, т. е. частиц, давших развитие грибов или актиномицетов. Методика посева и подсчета изложена в другой нашей работе [1]. Полученные результаты представлены в табл. 1 (для грибов) и в табл. 2 (для актиномицетов). В этих таблицах приводятся количества активных почвенных частиц, сосчитанные под микроскопом на площади агаровой пластинки, равной 3,92 см$^2$, соответствующей пяти агаровым кружочкам поперечником в 1 см. Рядом указаны показатели антимикробного действия. Они вычислены следующим образом. Если принять число активных почвенных частиц при навеске в 10 мг равным $a$, то при следующей навеске в 50 мг оно должно было равняться $5a$. Вследствие антимикробного действия число активных почвенных частиц при упятеренной навеске будет меньше $5a$, например $b$. Тогда показатель антимикробного действия или угнетения

$$y = \frac{5a - b}{5a} \cdot 100\%.$$

Из таблиц 1 и 2 видно, что с увеличением навески почвенных частиц количество развившихся грибов и актиномицетов относительно, а в некоторых случаях и абсолютно, уменьшается. Иными словами, чем теснее расположены частички почвы, тем меньше их активность, тем реже развиваются вокруг них грибы и актиномицеты. Во всех слу-

[1] Д. М. Новогрудский. Определение численности грибов и актиномицетов в почвах методом непосредственного высева почвенного мелкозема. Микробиология, т. XVI, стр. 492, 1947.

Таблица 1

**Число почвенных частиц, содержащих грибы, при различных навесках почвенного мелкозема**

| Навеска в мг | Число почвенных частиц, содержащих грибы | | | Показатель антимикробного действия | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0,5—0,25 мм | 0,25—0,125 мм | < 0,125 мм | 0,5—0,25 мм | 0,25—0,125 мм | < 0,125 мм |
| № 141. Темнокаштановая, глинистая, гор. А | | | | | | |
| 10 | 10 | 20 | 18 | — | — | — |
| 50 | 30 | 31 | 21 | 40,0 | 69,0 | 76,7 |
| 250 | 45 | 45 | 8 | 82,0 | 91,0 | 98,2 |
| № 152. Темнокаштановая, солонцеватая, гор. А | | | | | | |
| 10 | 19 | 69 | 188 | — | — | — |
| 50 | 60 | 148 | 171 | 38,9 | 57,1 | 81,8 |
| 250 | 83 | 128 | 75 | 82,5 | 92,6 | 98,4 |
| № 152а. Та же почва, гор. В | | | | | | |
| 10 | 2 | 10 | 9 | — | — | — |
| 50 | 8 | 32 | 11 | 20,0 | 36,0 | 75,5 |
| 250 | 21 | 24 | 3 | 58,0 | 90,4 | 98,7 |
| № 178. Солонец-солончак, гор. А | | | | | | |
| 10 | 16 | 31 | 12 | — | — | — |
| 50 | 46 | 67 | 25 | 42,5 | 57,4 | 58,4 |
| 250 | 69 | 87 | 16 | 82,8 | 88,8 | 94,7 |

чаях при посеве 10 мг самой мелкой почвенной фракции развивается больше грибов и актиномицетов, чем при посеве тех же почвенных частиц в количестве 250 мг, т. е. в 25 раз большем. Большее количество посеянной почвы приводит к развитию меньшего числа микроорганизмов. Такой результат может показаться неожиданным, но он абсолютно достоверен. Описанный опыт можно повторять сколько угодно раз с различными образцами почв; итог будет всегда один и тот же. Из этого следует, что почвенная масса в микробиологическом отношении не является простой суммой слагающих ее частиц. Микробиологическая активность почвы зависит не только от общего числа активных почвенных частиц, но и от их антимикробного действия. Показатели антимикробного действия закономерно возрастают по мере увеличения навески посеянного мелкозема и перехода от крупных частиц почвы к мелким. Из описанного опыта следует, что антимикробное действие наиболее резко выражено у почвенных частиц наименее мелких размеров и при более близком их расположении друг к другу.

Дальнейшие исследования имели целью установить, имеется ли непосредственная связь между антимикробным действием почвенных частиц и развитием находящихся на них микроорганизмов. Для этого было решено выяснить, как изменяется антимикробное действие почвенных частиц после их стерилизации. Те же образцы почв были, как и раньше, разделены на 3 фракции: мелкую (< 0,125 мм), среднюю (0,125—0,250 мм) и крупную (0,250—0,5 мм). Некоторую часть мелкой фракции (в воздушно-сухом состоянии) стерилизовали в автоклаве при 2 атм. в течение 30 минут. После этого произведен отдельно для крупной и средней фракции каждого образца посев на три пластины ага-

Таблица 2

**Число почвенных частиц, содержащих актиномицеты, при различных навесках мелкозема**

| Навеска в мг | Число почвенных частиц, содержащих актиномицеты | | | Показатель антимикробного действия | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0,5—0,25 мм | 0,25—0,125 мм | < 0,125 мм | 0,5—0,25 мм | 0,25—0,125 мм | < 0,125 мм |
| **№ 141. Темнокаштановая, глинистая, гор. А** | | | | | | |
| 10 | 44 | 68 | 162 | — | — | — |
| 50 | 77 | 137 | 146 | 65,0 | 59,7 | 82,0 |
| 250 | 108 | 74 | 59 | 90,2 | 95,7 | 98,6 |
| **№ 152. Темнокаштановая, солонцеватая, гор. А** | | | | | | |
| 10 | 27 | 118 | 274 | — | — | — |
| 50 | 68 | 128 | 325 | 49,7 | 78,3 | 76,3 |
| 250 | 19 | 135 | 37* | 97,2 | 95,4 | 95,5 |
| **№ 152а. Та же почва, гор. В** | | | | | | |
| 10 | 10 | 23 | 27 | — | — | — |
| 50 | 21 | 85 | 42 | 58,0 | 26,0 | 89,1 |
| 250 | 38 | 42 | 7 | 84,8 | 92,7 | 99,6 |
| **№ 178. Солонец-солончак, гор. А** | | | | | | |
| 10 | 39 | 116 | 56 | — | — | — |
| 50 | 57 | 106 | 105 | 80,7 | 81,7 | 62,5 |
| 250 | 68 | 14* | 5* | 93,1 | 99,5 | 99,7 |

* В этих чашках обнаружены нематоды, питающиеся актиномицетами, поэтому указанные числа являются преуменьшенными.

ризованной воды по 50 мг каждой фракции. Из каждой серии, состоящей из трех одинаковых пластинок, одну оставляли в качестве контроля без добавления частиц мелкой фракции (вариант а), к другой дополнительно высевали 100 мг простерилизованных частиц мелкой фракции (вариант б); к третьей — дополнительно высевали 100 мг непростерилизованных частиц той же мелкой фракции (вариант в). При такой постановке опыта следовало ожидать, что если антимикробное действие почвенных частиц непосредственно зависит от развития находящихся на них микроорганизмов, то дабавление стерилизованных частиц мелкой фракции не окажет угнетающего действия на грибы и актиномицеты крупной и средней фракции, т. е. число колоний в вариантах а и б будет одинаково и больше, чем в варианте в. Результаты опыта, полученные для грибов, представлены в табл. 3, а для актиномицетов — в табл. 4. В этих таблицах показано число микроскопических колоний, развившихся вокруг отдельных почвенных частиц, сосчитанное на площади агаризованной пластинки, равной 3,92 см$^2$. Показатели антимикробного действия в этих опытах вычислены так же, как в табл. 1 и 2, причем для третьего варианта (в) принималось в расчет количество грибов и актиномицетов, внесенных с добавочным посевом 100 мг почвенных частиц мелкой фракции.

Данные таблиц 3 и 4 показывают, что стерилизация нагреванием резко уменьшает антимикробное действие почвенных частиц. Это уменьшение неодинаково проявляется в отношении грибов и актиномицетов. В то время как прогретые в автоклаве почвенные частички

Таблица 3

**Антимикробное действие стерильных и нестерильных почвенных частиц (фракции<0,125 мм) на развитие грибов**

| Вариант посева | Число почвенных частиц, содержащих грибы | | Показатель антимикробного действия | |
|---|---|---|---|---|
| | 0,5—0,25 мм | 0,25—0,125 мм | 0,5—0,25 мм | 0,25—0,125 мм |
| **№ 141. Темнокаштановая, глинистая, гор. А** | | | | |
| а) Контроль, без добавления мелких частиц . | 16 | 31 | — | — |
| б) Добавление стерилизованных частиц . . . | 13 | 29 | [18,8]* | [6,5]* |
| в) » нестерилизованных » . . . | 9 | 19 | 84,5 | 74,0 |
| **№ 152. Темнокаштановая, солонцеватая, гор. А** | | | | |
| а) Контроль, без добавления мелких частиц . | 55 | 67 | — | — |
| б) Добавление стерилизованных частиц . . . | 37 | 69 | 32,7 | 0 |
| в) » нестерилизованных » . . . | 20 | 35 | 94,7 | 91,6 |
| **№ 152а. Та же почва, гор. В** | | | | |
| а) Контроль, без добавления мелких частиц . | 10 | 20 | — | — |
| б) Добавление стерилизованных частиц . . . | 9 | 20 | [10,0]* | 0 |
| в) » нестерилизованных » . . . | 2 | 6 | 93,7 | 85,7 |
| **№ 178. Солонец-солончак, гор. А** | | | | |
| а) Контроль, без добавления мелких частиц . | 24 | 35 | — | — |
| б) Добавление стерилизованных частиц . . . | 14 | 36 | 41,8 | 0 |
| г) » нестерилизованных » . . . | 5 | 10 | 93,3 | 88,2 |

* В скобки заключены недостаточно достоверные различия.

или не оказывают никакого угнетающего действия на грибы или оказывают только незначительное действие, угнетающее влияние их на актиномицеты проявляется довольно сильно. Из этих таблиц видна еще одна закономерность. Антимикробное действие наиболее мелких почвенных частиц, как правило, резче проявляется при действии их на более крупные частички почвы (0,5—0,25 мм), чем на более мелкие (0,25—0,125 мм).

Из изложенного надо заключить, что антимикробное действие мелких почвенных частиц — явление сложное и не может быть сведено к влиянию развивающегося на них микронаселения. Разумеется, имеющихся данных недостаточно, чтобы судить о причинах этих антимикробных свойств почвы. Для их выяснения требуются еще разносторонние исследования. Здесь возможно лишь подчеркнуть самый факт, что наиболее дисперсная часть почвы обладает мощным антимикробным действием. Разумеется, это действие не может быть обнаружено в культурах на жидких питательных средах, где отдельные частицы почвы обезличены, а развитие микроорганизмов происходит вне почвы. Антимикробное действие почвы проявляется лишь при достаточно близком расположении почвенных частиц. Можно поэтому считать, что в природных условиях, когда мелкие частички почвы тесно соприкасаются с частицами более крупных размеров, антимикробное действие почвы проявляется особенно сильно.

Таблица 4

**Антимикробное действие стерильных и нестерильных почвенных частиц (фракции < 0,125 мм) на развитие актиномицитов**

| Вариант посева | Число почвенных частиц, содержащих актиномицеты | | Показатель антимикробного действия | |
|---|---|---|---|---|
| | 0,5—0,25 мм | 0,25—0,125 мм | 0,5—0,25 мм | 0,25—0,125 мм |
| № 141. Темнокаштановая, глинистая, гор. А | | | | |
| а) Контроль, без добавления мелких частиц . | 61 | 20 | — | — |
| б) Добавление стерилизованных частиц . . . | 21 | 25 | 65,6 | 0 |
| в) » нестерилизованных » . . . | 12 | 9 | 96,6 | 97,1 |
| № 152. Темнокаштановая, солонцеватая, гор. А | | | | |
| а) Контроль, без добавления мелких частиц . | 27 | 66 | — | — |
| б) Добавление стерилизованных частиц . . . | 3 | 27 | 88,9 | 59,1 |
| в) » нестерилизованных » . . . | 4 | 13 | 99,4 | 98,2 |
| № 178. Солонец-солончак, гор. А | | | | |
| а) Контроль, без добавления мелких частиц . | 3 | 26 | — | — |
| б) Добавление стерилизованных частиц . . . | 4 | 16 | 0 | 38,4 |
| в) » нестерилизованных » . . . | 3 | 9 | 0 | 96,2 |

## III

Из факта антимикробного действия мелких почвенных частиц вытекают два вывода, которые могут быть экспериментально проверены.

Первый заключается в том, что активность грибов и актиномицетов на крупных почвенных частицах должна быть больше, чем на мелких. В другой работе [2] нами установлено, что относительная заселенность, т. е. процент частиц, заселенных данными микроорганизмами (бактериями, грибами, актиномицетами) у всех почв всегда определенно уменьшается с уменьшением размеров почвенных частиц. В свете изложенных выше данных такая закономерность становится вполне понятной. Основная причина такого распределения микроорганизмов заключается в антимикробных свойствах почвы, которые тем сильнее, чем меньше размеры почвенных частичек.

Другой вывод заключается в том, что искусственное или естественное распыление крупных почвенных частиц и агрегатов на более мелкие частицы должно вызвать усиление антимикробных свойств почвы и ухудшение условий развития микроорганизмов. Для проверки этого вывода был проведен следующий опыт с теми же образцами почв. Из каждого образца при помощи сит выделена фракция крупных, структурных частиц, размером 0,5—0,25 мм. Последние искусственно раздробляли в стерильной ступке и разделяли на три фракции: а) 0,5—0,25 мм, б) 0,25—0,125 мм и в) < 0,125 мм. Полученные в результате искусственного раздробления фракции а, б и в относились по весу, как 20 : 15 : 15. После этого на пластинки агаризованной воды производили посев по 50 мг первоначальной нераздробленной почвы (0,5—0,25 мм) и полученных после ее раздробления фракций а, б, в, также по 50 мг каждой. В табл. 5 приведено число микроскопических

[2] Д. М. Новогрудский. Влияние размеров почвенных частиц на распределение почвенных микроорганизмов. Микробиология, т. XVI, стр. 147, 1947.

колоний грибов и актиномицетов на площади агаровой пластинки, равной 3,92 см², для 50 мг первоначальных нераздробленных частиц и для 50 мг тех же частиц после их раздробления.

Таблица 5

**Влияние искусственного раздробления крупных почвенных частиц на развитие грибов и актиномицетов**

| № образца | Грибы | | Актиномицеты | |
|---|---|---|---|---|
| | до раздробления | после раздробления | до раздробления | после раздробления |
| 141 | 29 | 7 | 76 | 43 |
| 152 | 41 | 29 | 35 | 21 |
| 152а | 7 | 0,6 | 13 | 3 |
| 178 | 56 | 56 | 35 | 36 |

Полученные результаты показывают, что искусственное раздробление структурных агрегатов почвы (0,5—0,25 мм) вызывает угнетение активности грибов и актиномицетов. Это отчетливо проявляется во всех исследованных образцах почв за исключением последнего (обр. № 178, солонец-солончак), где искусственное раздробление не оказало никакого действия.

## IV

Изложенные материалы приводят к взгляду, что почве присущи две категории противоположных особенностей. С одной стороны, она вся пронизана микробной жизнью. Не опасаясь преувеличений, можно сказать, что не существует других природных тел, которые были бы так насыщены микроорганизмами, как почва. Почвенный покров земного шара является местообитанием огромного разнообразия микроорганизмов, и отсюда последние мигрируют в другие оболочки планеты: гидросферу, атмосферу и верхние слои литосферы. Эти особенности почвы можно именовать *биотическими*. С другой стороны, почва обладает мощной способностью задерживать жизнедеятельность микроорганизмов, подавлять и угнетать их развитие. Микробные резервы почвенной массы пребывают как бы связанными, и переход их от инертного к активному состоянию связан с еще не всегда известными условиями. Эти особенности почвенной массы можно именовать *антибиотическими*. Вся микробиологическая жизнь почвы определяется ее биотическими и антибиотическими свойствами. Мы еще не знаем, какие причины лежат в основе антибиотических свойств почвы. Здесь возможны различные предположения. Одно из возможных объяснений может заключаться в том, что антимикробное действие дисперсной части почвы связано с ее значительной адсорбционной способностью. С этой точки зрения инактивация микроорганизмов может происходить вследствие адсорбции каких-то важных для их жизнедеятельности веществ. Другое объяснение может заключаться в том, что в дисперсной части почвы содержатся особые вещества, угнетающие развитие грибов и актиномицетов. Третье из мыслимых допущений может заключаться в том, что антимикробная активность почвенных частиц, по крайней мере частично, непосредственно обусловлена жизнедеятельностью некоторых микроорганизмов, связанных с этими частицами. Какое бы из этих объяснений ни оказалось правильным, не подлежит сомнению, что антибиотические свойства почвы являются неизбежным следствием ее биотических свойств. С этой точки зрения биотические и антибиотические свойства почвы неразрывно связаны.

Вкратце развитые здесь представления об антимикробных свойствах почвы намечают ряд новых и интересных проблем почвенной микробиологии. Перечислим некоторые, наиболее важные.

1. Социалистическое сельское хозяйство СССР построено на травопольной системе земледелия. Центральным звеном этой системы является учение о зависимости плодородия почвы от ее комковатой структуры. В свете изложенных в этой статье данных становится ясным, что вместе с распылением комковатых агрегатов почвы возрастает ее антимикробная активность и существенно изменяются условия жизнедеятельности почвенного микронаселения. Таким образом, создается возможность осветить важнейший вопрос почвенной микробиологии — влияние агрегации и распыления почвы на ход ее микробиологических процессов.

2. Вопросы микробного антагонизма привлекают в настоящее время напряженное внимание микробиологов. Уже давно было замечено, что явления микробного антагонизма в почве протекают своеобразно, иногда значительно отличаясь от антагонизма тех же микробов на искусственных питательных средах. В свете представлений об антимикробных свойствах почвы становится возможным изучать в новом аспекте процессы антагонизма микробов в почве.

3. Дальнейшее изучение антимикробных свойств почвы и установление их причин позволят заглянуть в один из могущественных механизмов, при помощи которого в природе происходит подавление процессов микробной активности. Это сулит вооружить нас новым средством управления этими процессами.

## Выводы

Всякая почва способна при определенных условиях подавлять и полностью угнетать развитие микроорганизмов. Эти свойства почвы мы называем антимикробными.

Антимикробные свойства почвы наиболее резко проявляются в наиболее распыленных почвенных частицах диаметром $< 0{,}125$ мм и при наиболее тесном их расположении. Эта дисперсная часть почвенной массы обладает in situ сильно выраженной способностью подавлять развитие грибов и актиномицетов.

Антимикробное действие мелких почвенных частиц — явление сложное и не может быть сведено к влиянию находящихся на этих частицах микроорганизмов.

Стерилизация мелких почвенных частиц нагреванием резко снижает их антимикробную активность, но не одинаково в отношении грибов и актиномицетов. В то время как антигрибная активность простерилизованных частиц почвы почти нацело снимается, антиактиномицетная их активность остается довольно высокой.

Антимикробными свойствами мелких почвенных частиц объясняется то, что относительная заселенность крупных почвенных частиц грибами и актиномицетами больше, чем мелких. Этими же антимикробными свойствами распыленных почвенных частиц обусловлено, что при разрушении почвенных агрегатов и распылении почвы интенсивность микробиологических процессов снижается и жизнедеятельность грибов и актиномицетов сильно подавляется.

Представление об антимикробных свойствах почвы создает возможность с новых точек зрения осветить некоторые важные проблемы почвенной микробиологии.

Лаборатория микробиологии
Института почвоведения
Академии Наук Казахской ССР
Алма-Ата

*Получено 4.I.1948*

# О РОЛИ СПОРОНОСНЫХ БАКТЕРИЙ В ПОЧВЕННЫХ ПРОЦЕССАХ

*Е. Н. Мишустин*

Среди бактериального населения почвы довольно богато представлены спороносные формы. Они постоянно обнаруживаются при исследовании почвы, что заставляет причислить их к составу ее обычного микробного населения.

Вместе с тем до настоящего времени совершенно не осознана роль рассматриваемой группы микронаселения в почвенных процессах. Этот момент или молчаливо обходится даже в капитальных трудах по почвенной микробиологии, или о значении бациллярных форм высказывается совершенно парадоксальное мнение. Например, достаточно известный американский микробиолог Conn [6, 7] считает, что спороносные бактерии находятся в почве в инактивном состоянии и значительной роли в почвенных процессах не играют. Подобное представление делается не голословно и основывается, казалось бы, на некоторых экспериментальных материалах. Так, если производить посев пастеризованной и непастеризованной почвенной болтушки на твердую питательную среду, то сопоставление получаемых цифр показывает, что в обоих случаях вырастает примерно тождественное количество спороносных бактерий. Это дает повод думать, что по крайней мере основная масса бациллярных форм находится в почве в покоящемся состоянии.

Для иллюстрации мы приводим некоторые собственные данные, на первый взгляд подтверждающие высказанную точку зрения. Аналогичные же материалы можно найти и в работах других исследователей. При изучении микрофлоры различных почв Армении в 1947 г. мы обнаружили картину, отраженную в табл. 1. В данном случае почвы брались для анализа в период дождей, когда микрофлора могла активно размножаться в почве. Анализ производился посевом на МПА.

Как видно из приведенного материала, цифры второго и третьего столбцов практически совпадают. Лишь в некоторых случаях отмечается наличие некоторого преобладания вегетативных клеток над спорами. Отсюда, конечно, можно сделать вывод о том, что основная масса спороносных бактерий находится в почве в инактивном состоянии.

При критической оценке высказанного положения становится, однако, очевидной его несостоятельность. На самом деле, более чем странно думать, что большое число спороносных бактерий, достигающее нередко миллионов на 1 г почвы, извечно там находится в латентном состоянии. В то же время хорошо известно, что основным естественным субстратом, в котором содержится значительное число бациллярных форм, является именно почва. Невольно возникает вопрос: откуда же споры попадают в почву? Единственным основательным ответом будет признание возможности активного размножения спороносных бактерий в почве.

К данному заключению приводит и факт значительного обогащения спороносными бактериями более плодородных почв, которые содержат вообще больше микроорганизмов. Если взять, например, данные нижеприведенной таблицы 1, то нетрудно заключить, что бурая огород-

Таблица 1

**Соотношение чисел спороносных бактерий, учтенных при посеве пастеризованной и непастеризованной почвенных болтушек (число бактерий в тыс. на 1 г)**

| № п/п. | Анализируемая почва | Общее количество бактерий | Количество спороносных бактерий при посеве непастериз. болтушки | Количество спороносных бактерий при посеве пастериз. болтушки |
|---|---|---|---|---|
| 1 | Бурая почва фруктового сада под Ереваном | 11 400 | 3 410 | 2 750 |
| 2 | Бурая почва лесного насаждения под Ереваном | 2 400 | 250 | 120 |
| 3 | Бурая почва под хлопчатником около Эчмиадзина | 14 000 | 600 | 620 |
| 4 | Серозем, огород около Октемберян | 4 750 | 400 | 223 |
| 5 | Чернозем, огород около Степанована | 1 750 | 40 | 23 |
| 6 | Чернозем, целина (Актинский район) | 2 360 | 110 | 36 |
| 7 | Горно-луговая почва, Пушкинский перевал | 1 170 | 90 | 81 |
| 8 | Горно-лесная почва, ниже Пушкинского перевала | 3 300 | 300 | 200 |

ная почва (№ 1) имеет в 15—20 раз больше спороносных бактерий, чем недалеко расположенная бурая же неокультуренная почва склона горы (№ 2). Совершенно очевидно, что спороносные бактерии размножаются в почвах точно так же, как и не образующие спор формы, хотя темпы этого размножения, как мы увидим дальше, имеют своеобразные отличия.

Нам представляется, что почвенные микробиологи в принципе неправильно оценивают состояние спороносных бактерий в почве. Суммарный учет числа спор не вскрывает внутренних перегруппировок, скрывающихся за общими показателями. При кажущемся отсутствии резко выраженной динамики в составе спороносного населения почвы, без сомнения, в отдельных микрозонах почвы споры прорастают, в других же — вновь образуются. Гетерогенность почвы, как среды, обусловливает в один и тот же момент, но в разных частицах почвы наличие далеко не тождественных условий. Обычные же наши методы анализа дают какие-то средние, выравненные показатели, не позволяющие различать тонкой специфики жизни микробов в отдельных частицах почвы.

Довольно значительный материал, имеющийся в нашем распоряжении, заставляет притти к выводу, что деятельность спороносных бактерий связана в почве с трансформацией относительно стабильных форм органического вещества и, может быть, с превращением продуктов, синтезированных микроорганизмами, производящими разрушение более подвижных соединений растительных и животных остатков. Мы, конечно, учитываем способность спороносных бактерий питаться весьма разнообразными органическими соединениями, но, как это будет показано дальше, в природной обстановке при наличии микробных популяций на распадающейся массе, богатой легкодоступными веществами, неспороносные бактерии оказываются более конкурентоспособными и вытесняют бациллярные формы. Лишь позднее доминирующая роль переходит к спороносным бактериям.

Отмеченные факты позволяют думать, что богатство почвы спороносными бактериями и наличие в ней определенных видов данных микроорганизмов отражают направление процесса трансформации органического вещества, свойственного собственно почве. Таким об-

разом, состояние спороносных бактерий выявляет тип почвообразовательного процесса, и доказательству этого мы посвящаем следующие статьи.

В настоящей работе приводится материал, иллюстрирующий преобладающую роль бациллярных форм в превращениях относительно стабильных органических соединений почвы. О природе последних каких-либо определенных данных пока не имеется.

Высказанное выше положение подтверждается следующими последовательно развитыми соображениями.

1. При минерализации органических остатков в первой фазе размножаются преимущественно неспороносные бактерии. Лишь после значительного уменьшения их числа заметно возрастает абсолютное и главным образом относительное число спороносных бактерий.

Отмеченное положение с полной очевидностью вырисовывается как на основании собранного нами экспериментального материала, так и работ других исследователей. Особенно показательны в этом отношении данные Красильникова и Никитиной [2], полученные при изучении состава микрофлоры разлагающихся корней различных растений. В отмеченной работе говорится: «Качественный состав их (бактерий) при этом резко меняется. Как правило, сначала развиваются неспороносные бактерии. Спороносных нет, или очень мало. Затем число спороносных становится больше».

Аналогичную картину наблюдали и мы [3, 4] при проведении многочисленных опытов. Например, в одном из опытов с разлагающимися корнями люцерны были получены данные, приводимые в табл. 2.

Таблица 2

**Соотношение спороносных и неспороносных бактерий в разлагающихся корнях люцерны**

| № п/п. | Наблюдаемые формы бактерий | Количество бактерий в тыс. в сроки, истекшие с момента закладки компоста, в днях | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 15 | 45 | 90 | 240 |
| 1 | Неспороносные . . . . . | 104 000 | 21 000 | 10 | 10 |
| 2 | Спороносные . . . . . | 10 | 10 | 12 000 | 3 000 |

В особых пояснениях данная таблица не нуждается.

Объективность требует, однако, отметить, что в некоторых случаях на разлагающихся органических остатках спороносные бактерии относительно быстро начинают размножаться, но их число все же остается несопоставимо более низким, чем число неспороносных форм. Отмечаемые случаи относятся к компостам, богатым белками, без наличия которых спороносные бактерии развиваются плохо. Нам вообще представляется, что более позднее развитие бацилл на органической массе является следствием двух причин: с одной стороны, наличия у них более мощного ферментативного аппарата, позволяющего использовать недоступные для неспороносных бактерий вещества, а с другой,— обогащения среды белком за счет микробного синтеза. Отмирая, неспороносные бактерии подготовляют субстрат для развития иного, более требовательного к пище микробного ценоза.

Позднее развитие спороносных бактерий на субстрате может быть связано и с более медленным темпом их размножения. Общеизвестная кривая Бьюкенена, установленная для неспороносных бактерий, имеет для бациллярных форм значительно более пологий ход в логарифмической фазе размножения.

Во всяком случае приведенный материал достаточно наглядно подтверждает наше мнение о спороносных бактериях как о формах, завершающих процесс минерализации.

Сообщенные нами факты вполне подтверждаются материалами, полученными в области пищевой микробиологии. Известно, что на первых фазах гниения любых пищевых веществ в основном размножаются лишь неспороносные бактерии.

2. В зоне ризосферы, куда из корня поступают углеводы и органические кислоты, главным образом размножаются неспороносные бактерии (Красильников [1] и др.). Лишь после отмирания растений постепенно в зоне корня начинают в заметном количестве обнаруживаться бациллярные формы.

Причина отмеченного явления вполне понятна с развиваемой нами точки зрения и не нуждается в дополнительных комментариях.

3. Весьма наглядно выступает связь спороносных форм бактерий с менее мобильными органическими веществами при анализе почвенного профиля. Как известно, наиболее богаты бактериями верхние слои почвы. Постепенно, с углублением в почву, число бактерий снижается, и темпы этого снижения полностью связаны с особенностями того или иного почвенного типа. Замечательно, однако, соотношение бактериальных форм в отдельных горизонтах почвы. С совершенно исключительной четкостью вырисовывается преобладание в более глубоких слоях почвы спороносных бактерий. Это мы связываем с относительным обеднением нижних горизонтов почвы мобильными формами органического вещества, так как корневая масса в основном находится в верних слоях почвы.

Отмеченный момент иллюстрируется нами на примере глубокопрофильной темнобуроземной лесной почвы южной Киргизии. Аналогичная закономерность, впрочем, с неменьшей яркостью обнаруживается и на других почвенных типах.

Таблица 3

**Соотношение спороносных и неспороносных бактерий в различных горизонтах буроземной почвы (число бактерий, выросших на МПА, в тыс. на 1 г)**

| Генетические горизонты | Глубина в см | Общее число бактерий | % спороносных форм | Bac. mycoides |
|---|---|---|---|---|
| $A_1$ | 1—15 | 1 280 | 13,3 | 8,0 |
| $A_2$ | 16—30 | 926 | 42,7 | 6,0 |
| $A_3$ | 45—50 | 183 | 100,0 | 2,0 |
| $A_4$ | | | | |
| $A_5$ | 65—90 | 3,9 | 100,0 | 0 |

Объяснить преобладание спороносных бактерий в более глубоких слоях почвы их лучшей приспособленностью к анаэробиозу нельзя. Как видно, Bac. mycoides, в отличие от прочих спороносных бактерий, лучше всего размножается в верхних горизонтах почвы и, подобно неспороносным формам, число его зародышей постепенно уменьшается по мере углубления в почву. Между тем Bac. mycoides довольно хорошо переносит анаэробную обстановку, но, как показывают наши наблюдения, этот микроб появляется на более ранних этапах минерализации органических остатков, чем другие спороносные бактерии. Следовательно, Bac. mycoides по своему отношению к среде должен несколько напоминать неспороносных бактерий, что на самом деле и отмечается в приведенном примере.

4. Агрохимические мероприятия, приводящие к уменьшению подвижного органического вещества в почве, связаны с возрастанием в ней удельного веса бациллярного населения. Как известно, внесение в почву в течение длительного срока минеральных удобрений (особенно азота) уменьшает в почве процент органического вещества в силу интенсификации его распада. Мы изучили состав бактериального населения ряда делянок Соликамской опытной станции [5], в течение 15 лет получавших ежегодно полную норму минеральных солей (NPK). Как видно из данных табл. 4, это мероприятие привело к уменьшению микробного неспороносного населения, но одновременно резко возросло число спороносных форм.

Таблица 4

**Изменение состава бактериального населения почв Соликамской опытной станции под влиянием минеральных удобрений (число бактерий в тыс. на 1 г)**

| № п/п. | Изученная почва | Количество неспороносных бактерий | | | Количество спороносных бактерий | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 17/V | 10/VIII | 30/IX | 17/V | 10/VIII | 30/IX |
| 1 | Контрольная . . . . . | 391 | 195 | 251 | 79 | 155 | 114 |
| 2 | Удобренная NPK . . . . . | 73 | 15 | 120 | 116 | 195 | 92 |

Длительное время удобрявшаяся туками почва довольно сильно подкислилась, но приведенные сдвиги в соотношении бактериальных форм этим нельзя объяснить, так как бациллы не менее чувствительны к кислотности среды, чем неспороносные бактерии. Отмеченная перегруппировка связана, конечно, с вышеуказанными изменениями в составе органического вещества почвы.

5. Заслуживает быть отмеченным также тот факт, что молодые почвы, достаточно еще не обогатившиеся органическим веществом, свойственным почве, весьма бедны спороносными бактериями, при относительно сильной их общей обсемененности микроорганизмами. По мере формирования почвы, как естественно-исторического тела, удельный вес спороносных бактерий возрастает. Это положение весьма наглядно обрисовывается нашими данными, приведенными в табл. 5.

Таблица 5

**Соотношение спороносных и неспороносных бактерий в разных почвах (в тыс. на 1 г)**

| № п/п. | Изученные материалы | Место взятия пробы | Общее число бактерий | Число спороносных бактерий | % спороносных бактерий |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | Почва на первых фазах ее формирования | Алагез (высота 4 000 м) | 1 032 | 0,4 | 0,04 |
| 2 | Соскоб лишайника с камня | Спитакский перевал (высота 2 500 м) | 1 200 | 2,0 | 0,17 |
| 3 | Гумусоподобная масса из подушки мха на камне | То же | 3 500 | 140,0 | 4,0 |
| 4 | Горно-луговая почва | » » | 3 020 | 266 | 8,8 |

Приведенные факты свидетельствуют о том, что лишь при появлении органического вещества, свойственного собственно почве, заметно возрастает удельный вес спороносных бактерий.

6. Как уже отмечалось, ряд данных показывает большую требовательность спороносных бактерий к субстрату. На самом деле, если мы знаем, что на МПА спороносные бактерии прекрасно развиваются, то на среде Чапека и Конна, в которых органический азот заменен минеральным, большинство из них не растет.

Так как в почву поступают преимущественно не столь богатые белком органические остатки, то доминирование на первых фазах их распада неспороносных бактерий не вызывает удивления. Постепенное обогащение субстрата белком микробного синтеза делает возможным и успешный рост бацилл.

Очевидно, с последним сопряжена и выработка неспороносными бактериями ряда факторов роста, к недостатку которых весьма чувствительны многие спороносные бактерии.

Таким образом, совокупность ряда данных заставляет нас предполагать, что спороносные бактерии весьма тесно связаны с трансформацией уже более переработанного вещества органических остатков.

Следует полагать, что отдельные фазы отмечаемого распада проводятся различными микробными ценозами, состав которых пока достаточно не выяснен. Тем не менее имеющийся в нашем распоряжении материал, частично уже опубликованный, позволяет установить место отдельных спороносных форм в процессе минерализации. Так, Bac. mycoides появляется в массовом количестве при распаде органических остатков более рано, чем Bac. mesentericus. В связи с тем, что темпы превращения органических веществ не тождественны в условиях разных климатических зон, мы констатируем закономерные изменения в соответствующих почвах числа зародышей данных микробов, помимо заметной разницы в обсемененности их спороносными бактериями вообще. Материалы, иллюстрирующие это положение, будут приведены в последующих работах.

Мы считаем, что наши исследования являются лишь первыми вехами, устанавливающими коррелятивную связь между типом почвы и ее микробным населением. Дальнейшая работа позволит расширить представления о данной связи и включить в орбиту изучения не только спороносные бактерии, но и другие группы почвенных микроорганизмов.

## Выводы

В настоящей работе автор приводит ряд данных, свидетельствующих о том, что спороносные бактерии связаны с превращением относительно малоподвижных форм органических остатков почвы, которые можно рассматривать как соединения, свойственные собственно почве.

Это заключение основывается на факте более позднего появления бациллярных форм при минерализации органических остатков, своеобразном распределении спороносных бактерий в почвенном профиле, изменении соотношения спороносных и неспороносных бактерий при обеднении почвы подвижными органическими веществами и ряде других соображений.

Отмечаемое положение заставляет признать, что показатели, говорящие о богатстве почв спороносными бактериями вообще и определенными видами данных микроорганизмов в частности, могут быть использованы при определении направленности хода почвообразовательного процесса.

Институт микробиологии
Академии Наук СССР
Москва

*Получено 15. XII. 1947*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Красильников Н. А., Рыбалкина А. В. и др. Микробиологическая характеристика почв Заволжья. Тр. Комиссии по ирригации, т. I, 1919.
2. Красильников Н. А. и Никитина Н. И. Влияние разлагающихся корней на состав микрофлоры в почве. Почвоведение, № 2, 132, 1945.
3. Мишустин Е. Н. и Тимофеева А. Г. Смена микрофлоры при процессе разложения органических остатков в связи с развитием в почве Bac. mycoides. Микробиология, т. XIII, вып. 6, стр. 272, 1944.
4. Мишустин Е. Н. Эколого-географическая изменчивость почвенных бактерий. Москва, Изд. АН СССР, 1947.
5. Мишустин Е. Н. и Прокошев В. Н. Влияние длительного применения минеральных удобрений на микробиологическую активность в почве. Микробиология (в печати).
6. Conn H. J. Soil flora studies. III. Spore forming bacteria in soil. N. Y. Agr. Exp. Sta. Tech. Bull. No. 58, 1917.
7. Conn H. J. Are spore-forming bacteria of any significance in soil under normal condition. N. Y. Agr. Exp. Sta. Tech. Bull. No. 51, 1916.

# О ЗНАЧЕНИИ ВОДОРОДА, НЕПОСРЕДСТВЕННО СВЯЗАННОГО С УГЛЕРОДНЫМ АТОМОМ, В ФИКСАЦИИ МОЛЕКУЛЯРНОГО АЗОТА АЗОТОБАКТЕРОМ

*М. В. Федоров*

В нашей работе [3], посвященной изучению зависимости между химической структурой используемого азотобактером органического вещества и фиксацией им азота атмосферы, были приведены экспериментальные данные, позволяющие признать, что такой зависимости не существует, хотя в отдельных случаях и наблюдается известная пропорциональность в фиксации. В частности, такая пропорциональность была обнаружена при использовании азотобактером двухосновных органических кислот: янтарной, яблочной и винной. Наиболее продуктивно связывается атмосферный азот на янтарной кислоте и наименее продуктивно на винной кислоте. Для объяснения констатированной разницы нами было выдвинуто положение, что «внедрение атомов кислорода в молекулу однотипных соединений меняет в ней запас химической энергии, качество углерода и водорода... и понижает продуктивность азотфиксации» [4].

В выступлении по нашему докладу Гапоном было отмечено, что указанную выше разницу проще объяснить тем, что «азотобактер для фиксации может использовать только водород, связанный с углеродом; водород гидроксильной и карбоксильной групп не может быть использован азотобактером. Содержание активного водорода, т. е. связанного непосредственно с угледором, для указанных трех кислот будет:

$$\text{янтарная кислота} : \text{яблочная кислота} : \text{винная кислота} = 4:3:2 = 2:15:1$$

Как видим из таблицы М. В. Федорова, это и имеет место в действительности: на янтарной кислоте количество связанного азота в два раза больше, чем на винной кислоте, а на яблочной — в полтора раза»[1]. Несмотря на то, что в нашей таблице приводились только предварительные данные, где фиксация азота была выражена на 1 г взятого в опыт вещества (тогда еще не все анализы были закончены), и эти данные изменились, когда было определено количество действительно использованного азотобактером органического вещества, Гапон утверждал, что им установлена новая закономерность в фиксации азота атмосферы азотобактером [1]. Так как дискуссия получила дальнейшее развитие, то возникла необходимость более подробно разобрать существо затронутого вопроса, тем более, что он имеет более широкую сферу применения, чем фиксация азота азотобактером.

Для всякого совершенно ясно, что наше объяснение, связывавшее продуктивность фиксации азота с изменением состояния вещества при внедрении в него атомов кислорода, полностью исчерпывает объяснение Гапона, как частный случай, связанный с этим внедрением.

---

[1] Из выступления Е. Н. Гапона по докладу М. В. Федорова, Доклады ТСХА, вып. I, стр. 59, 1945.

Для этого достаточно выписать только структурные формулы упоминавшихся выше органических кислот[2]:

$$\begin{matrix}CH_2\cdot COOH\\ |\\ CH_2\cdot COOH\end{matrix} + \tfrac{1}{2}O_2 = \begin{matrix}CH\cdot O\underline{H}\cdot COOH\\ |\\ CH_2\cdot COOH\end{matrix}$$

*Янтарная кислота* *Яблочная кислота*

$$\begin{matrix}CH_2\cdot COOH\\ |\\ CH_2\cdot COOH\end{matrix} + O_2 = \begin{matrix}CH\cdot O\underline{H}\cdot COOH\\ |\\ CH\cdot O\underline{H}\cdot COOH\end{matrix}$$

*Янтарная кислота* *Винная кислота*

Эти формулы ясно показывают, что при внедрении кислорода меняется не только состояние водорода, но и состояние углерода и запас энергии в веществе. Поэтому уточнение высказанной нами мысли не вносит принципиально ничего нового. Однако существо дела не в этом. Существо дела заключается в том, что для всех физиологических процессов вообще, в том числе и для азотфиксации в частности, первостепенное значение имеет не состояние водорода, а состояние углерода в молекуле используемого вещества. Для того чтобы важность этого положения была достаточно ясной, придется привести часть экспериментального материала, на основе которого можно установить, что в биохимических процессах, протекающих в сложной системе живой протоплазмы, не наблюдается различия между водородом гидроксила и водородом радикала[3], или, как его неправильно называет Гапон, активным водородом. В биохимических процессах постоянно имеют место переходы одной формы водорода в другую. Вот примеры: Bact. gracile легко сбраживает янтарную кислоту в пропионовую по уравнению:

$$\begin{matrix}CH_2\cdot COO\underline{H}\\ |\\ CH_2\cdot COOH\end{matrix} = \begin{matrix}CH_3\\ |\\ CH_2\cdot COOH\end{matrix} + CO_2 + x\ k\text{-}kal$$

За счет отщепления углерода в форме углекислоты окисленный водород карбоксила переходит в восстановленную форму водорода радикала. То же наблюдается при сбраживании яблочной кислоты в молочную:

$$\begin{matrix}CH_2\cdot COO\underline{H}\\ |\\ CH\cdot OH\cdot COOH\end{matrix} = \begin{matrix}CH_3\\ |\\ CH\cdot OH\cdot COOH\end{matrix} + CO_2 + x\ k\text{-}kal$$

или же при сбраживании уксусной кислоты в метан при помощи бактерий, изученных Омелянским:

$$CH_3\cdot COO\underline{H} = CH_4 + CO_2 + x\ k\text{-}kal$$

Таких случаев можно подобрать довольно много, но так как они хорошо изучены и широко известны, то нет смысла останавливаться

[2] Во всех формулах водород радикала отмечен точкой, а водород гидроксила чертой.

[3] Во всех случаях под водородом радикала разумеется водород, непосредственно связанный с углеродным атомом.

на этом подробнее. Для того чтобы возможность таких переходов стала еще более ясной, приведем и обратные случаи перехода водорода радикала в гидроксильную форму. При помощи «меченого» углерода ($C^{13}$) Вуду и Веркману удалось доказать, что под влиянием Bact. coli углекислота присоединяется к пировиноградной кислоте, в результате чего образуется щавелевоуксусная кислота по уравнению:

$$\begin{array}{l} CH_3 \\ | \\ CO.COOH \end{array} + CO_2 = \begin{array}{l} CH_2.COO\underline{H} \\ | \\ CO.COOH \end{array}$$

Такой же процесс присоединения углекислоты к пропионовой имеет место в культурах пропионовокислых бактерий. В этом случае образуется янтарная кислота:

$$\begin{array}{l} CH_3 \\ | \\ CH_2.COOH \end{array} + CO_2 = \begin{array}{l} CH_2.COO\underline{H} \\ | \\ CH_2.COOH \end{array}$$

Аналогичное взаимодействие установлено Фишером между метаном и углекислотой в культурах ряда анаэробных бактерий:

$$\underline{CH_4} + CO_2 = \underline{CH_3}.COO\underline{H}$$

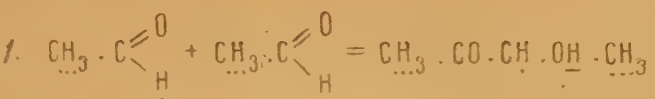
Как показывают приведенные уравнения, эти процессы обратимы и постоянно осуществляются в культурах самых различных анаэробных бактерий. Они связаны с изменением состояния углеродных атомов в веществе. В тех процессах, где наблюдается переход водорода гидроксила к углеродному атому, происходит отщепление углерода в форме углекислоты, а там, где водород от углеродного атома снова переходит в гидроксильную форму, наоборот, имеет место присоединение углекислоты, т. е. там и здесь процессы осуществляются за счет изменения состояния углеродных атомов.

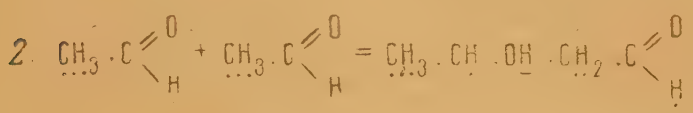
Против приведенных фактов можно сделать только одно возражение: может быть, эти процессы совершаются в системе живой протоплазмы сопряженно с какими-нибудь другими процессами. Однако это возражение не имеет силы по двум причинам: во-первых, при переходе водорода карбоксильной группы к углероду радикала имеет место отщепление углекислоты, сопровождающееся выделением энергии, за счет которой соответствующая бактерия и развивается в анаэробных условиях, и, во-вторых, известны ферментативные процессы, легко осуществляющиеся in vitro, в результате которых также наблюдается взаимный переход водорода радикала в гидроксильную форму и обратно. Классическим примером такого рода ферментативных реакций является расщепление пировиноградной кислоты карбоксилазой, при котором имеет место переход водорода гидроксила к углеродному атому по уравнению:

$$CH_3.CO.COO\underline{H} = CH_3.C\begin{array}{l} \diagup\!\!\!\diagup O \\ \diagdown H \end{array} + CO_2$$

Это одна из важнейших реакций всех брожений. Обратный переход водорода углеродного атома в гидроксильную форму осуществляет-

ся при воздействии на уксусный альдегид фермента карболигазы (Нейберг):

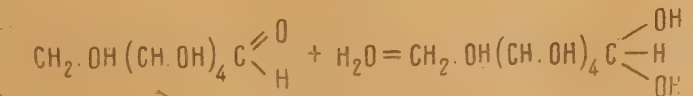




Таким образом, выходит, что взаимные переходы водорода гидроксила к углеродному атому и обратно легко осуществляются не только в сложной системе живой протоплазмы бактерий за счет каких-нибудь сопряженных реакций, но и в результате чисто ферментативных процессов, легко осуществляемых in vitro, где сопряженность бесспорно отсутствует.

Однако этими фактами дело не ограничивается. Как покажут нижеследующие данные, специфическое различие между водородом гидроксила и водородом радикала вообще невозможно в протоплазме живой клетки, где активация водорода осуществляется при помощи ферментов дегидраз. Благодаря обширным исследованиям Палладина, Вилянда, Варбурга и многих других исследователей, мы знаем, что в системе бактериальных клеток встречаются первичные и вторичные дегидразы. В основе работы первичных дегидраз лежат превращения пиридин-нуклеотидов, а в основе работы вторичных дегидраз — превращения аллоксазиновых нуклеотидов. Работа первых покоится на обратимом переходе пиридина в дигидропиридин, а работа вторых — на обратимом переходе аллюксазина в дигидроаллоксазин. При отщеплении водорода от органического вещества простетическая группа дегидразы (пиридин-нуклеотид) соединяется с одним белком в качестве коллоидного носителя, а при передаче водорода от дегидразы к акцептору активная группа соединяется с другим белком в качестве коллоидного носителя [4].

Для того чтобы быть конкретным и избежать возражения, что эти случаи связаны с другими бактериями (а в нашем случае интересует прежде всего азотобактер), я разберу далее несколько случаев окисления органических веществ непосредственно в клетках азотобактера. Как бесспорно установлено работами многих исследователей, в составе протоплазмы азотобактера имеются дегидразы. Зная механизм их действия, разберем случаи окисления азотобактером глюкозы, при использовании которой в качестве источника углерода особенно легко осуществляется процесс азотфиксации. Как показали наши [5] исследования с влиянием гликолитических ядов, это вещество может окисляться азотобактером как без предварительного разрыва шестичленной цепи углеродных атомов, так и с разрывом ее на две триозы. Начнем с первого случая. Наиболее уязвимой группой в глюкозе является альдегидная группа, по месту которой присоединяется вода и получается гидратная форма альдегида:



[4] Подробная схема взаимодействия активной группы с ферментными белками приводится в статье В. А. Энгельгардта «Ферменты брожения» (см. Сб. «Ферменты», 1940).

Пиридиновая дегидраза активирует два водорода этого гидрата и присоединяет их к себе:

$$CH_2.OH(CH.OH)_4C\begin{matrix}\diagup OH\\ \diagdown \underset{\cdot}{H}\\ \diagdown OH\end{matrix} + \textit{пиридин-протеид} = CH_2\ OH(CH\ OH)_4C\begin{matrix}\diagup\!\!\diagup O\\ \diagdown OH\end{matrix} +$$

$$+ \underset{\cdot}{H}.\underline{H} - \textit{пиридин-протеид}$$

Как можно видеть из этого уравнения, альдегидная группа глюкозы перешла в карбоксильную (образовалась глюконовая кислота), а два водорода перешли к дегидразе (пиридин-протеиду). При этом существенно отметить, что один из этих водородов взят от гидроксильной группы, а другой водород — от радикала. Они оба с одинаковым успехом отщеплены дегидразой и, перейдя к ней, потеряли свою индивидуальность и обезличились. Когда же обезличенный водород от дегидразы перейдет к акцептору, приписывать ему специфические особенности становится совершенно невозможным. Если этим акцептором будет молекулярный кислород, активированный геминным ферментом, то водород от дегидразы через посредство желтого дыхательного фермента Варбурга пойдет на образование перекиси водорода, а если акцептором будет молекулярный азот, то должен образоваться аммиак. Но в этом аммиаке один атом водорода будет иметь гидроксильное происхождение, а другой атом будет получен от радикала. При дальнейшем воздействии дегидразы на глюконовую кислоту будет активироваться водород углеродного атома, расположенного рядом с карбоксильной группой:

$$CH_2.OH(CH.OH)_3\ \underset{\cdot}{CH}.O\underline{H}.C\begin{matrix}\diagup\!\!\diagup O\\ \diagdown OH\end{matrix} + \textit{дегидраза} =$$

$$= CH_2.OH(CH.OH)_3.CO\,C\begin{matrix}\diagup\!\!\diagup O\\ \diagdown OH\end{matrix} + \underset{\cdot}{H}.\underline{H} - \textit{дегидраза}$$

Опять к дегидразе присоединились два атома водорода: один водород от гидроксильной группы, а другой от радикала. Опять они в обезличенной форме передаются соответствующему акцептору. Если и здесь акцептором будет молекулярный азот, опять образуется аммиак, в котором половина водорода будет от гидроксильной группы и половина от радикала. Вслед за этим произойдет декарбоксилирование кетоглюконовой кислоты — водород гидроксильной группы карбоксила превратится в водород радикала:

$$CH_2.OH(CH.OH)_3.CO.C\begin{matrix}\diagup\!\!\diagup O\\ \diagdown O\underline{H}\end{matrix} = CH_2.OH(CH.OH)_3C\begin{matrix}\diagup\!\!\diagup O\\ \diagdown \underset{\cdot}{H}\end{matrix} + CO_2$$

После этого к альдегидной группе пентозы вновь присоединяется вода и опять из гидрата альдегида снимаются два водорода: один от радикала, а другой от гидроксильной группы. И если бы они вновь передавались азоту для восстановления его в аммиак, то опять последний имел бы в своем составе гидроксильный водород и водород радикала в равных количествах. Так будет повторяться до тех пор, пока глюкоза не подвергнется полному окислению до углекислоты и

воды. Поэтому переход углеродных атомов глюкозы в углекислоту следует выражать давно уже предложенным уравнением Палладина:

$$1.\ C_6H_{12}O_6 + 6H_2O = 6CO_2 + 24H$$

Благодаря тому, что в реакции постоянно участвует вода, к дегидразе присоединяются 24 обезличенных атома водорода, среди которых имеются всего лишь 7 бывших водородов радикала, не отличимых теперь никакими способами от остальных 17 водородов гидроксильного происхождения. Если сжигание водорода производится молекулярным кислородом, то уравнение принимает следующий вид:

$$2.\ 24H + 6O_2 = 12H_2O$$

Суммирование двух этапов процесса дает классическое уравнение аэробного дыхания:

$$3.\ C_6H_{12}O_6 + 6O_2 = 6CO_2 + 6H_2O + 674\ k\text{-}kal$$

При таком механизме активации водорода о специфической роли водорода радикала не приходится говорить, так как это противоречит бесспорно установленным фактам. В химической динамике жизненных процессов Оппенгеймер [2] следующим образом формулирует этот факт: «Распад углеводов может быть представлен как гидролиз с присоединением воды, при котором все соединение постепенно расщепляется вследствие того, что кислород в виде гидроксильного иона переводит углерод в $CO_2$. Освобождающийся же из воды водород присоединяется к водородам разложенного углевода. Присоединение OH к C связано с отдачей энергии, отщепление же водорода — с ее поглощением. В результате весь процесс протекает лишь с ничтожным уменьшением свободной энергии ($\Delta F = -6277$ г/кал; $\Delta H = +145\,220$ г/кал)». Эти положения биохимии указывают на то, что водород радикала не несет специфических функций в биологических процессах.

Если в ходе мобилизации водород будет передан молекулярному азоту и восстановит его до аммиака, то уравнение его конечного превращения примет следующий вид:

$$24H + 4N_2 = 8NH_3$$

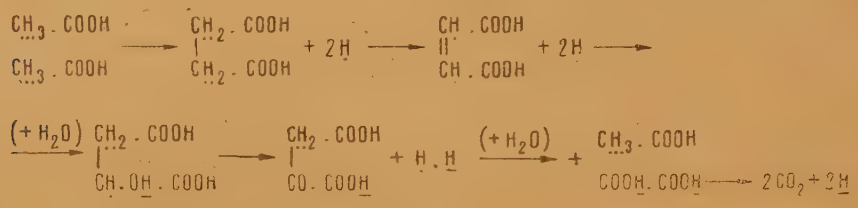
Из этого уравнения можно видеть, что на каждый моль разложенной глюкозы может фиксироваться четыре молекулы азота с образованием восьми молекул аммиака. Возможность столь высокой продуктивности азотфиксации обеспечивается не только наличием 24 атомов активированного водорода на каждый моль глюкозы, но и достаточным запасом химической энергии, содержащейся в глюкозе. По расчетам Оппенгеймера, энергетический баланс этой рекации будет отвечать следующим величинам: при $t = 300°$, $O_2 = 0{,}2$ атм, $N_2 = 0{,}8$ атм, $NH_3 = 0{,}001$ моля (с учетом нейтрализации в клетке азотобактера) получится: $^1/_2N_2 + {}^3/_2H_2O = NH_3 + {}^3/_4O_2$; $\Delta F = +70\,000$ г/кал.

При окислении же моля глюкозы при тех же условиях получается $\Delta F = -711\,500$ г/кал. Следовательно, 1 моль глюкозы может обеспечить энергией фиксацию с образованием 10 молей аммиака. Поэтому синтез 8 молей аммиака, обеспечивающийся водородом за счет дегидрирования глюкозы, вполне возможен и с энергетической точки зрения, но почему азотобактер фиксирует только одну сотую часть возможного количества,— пока еще остается загадкой, хотя и

нет никаких сомнений в том, что ее разгадка не связана и не может быть связана со специфическим участием водорода радикала.

Совершенно аналогично идет мобилизация водорода и в том случае, если глюкоза подверглась предварительному десмолизу на глицериновый альдегид и диоксиацетон.

Так же идет мобилизация водорода из глицерина, маннита и других органических соединений, содержащих значительное количество гидроксильных групп. Только окисление насыщенных кислот жирного ряда будет иметь некоторые отличия. Если для примера взять уксусную кислоту, то мобилизация водорода из нее пойдет так:



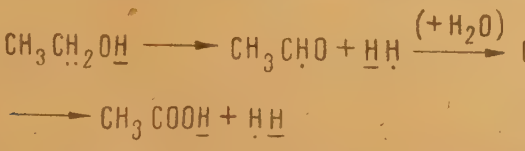
На каждом из показанных здесь этапов дегидраза снимает два водорода. На первых этапах процесса два раза снимается по два водорода от углеродных атомов, а на последующих этапах два раза снимается по одному водороду от гидроксильной группы и от углеродного атома. Так как в конечном итоге этого процесса из двух молекул уксусной кислоты, вошедших в реакцию, только одна полностью окислялась, то можно считать установленным, что в ходе дегидрирования из уксусной кислоты отщепляется пять водородов радикала, несмотря на то, что в ней, если исходить только из структурной формулы, содержится всего три водорода радикала. Если бы процесс азотфиксации у азотобактера был связан со специфическим участием водорода радикала, то при его развитии на уксусной кислоте должна была бы наблюдаться необычайно высокая продуктивность этого процесса, в 2—3 раза превосходящая продуктивность на глюкозе. Однако наши данные показывают, что на один грамм водорода радикала уксусной кислоты фиксируется только 83 мг атмосферного азота (вместо 211 мг на глюкозе), а на 1 к-кал. запаса химической энергии — только 1,18 мг (вместо 2,1 мг на глюкозе).

Из приведенной схемы видно, что при мобилизации водорода янтарной и фумаровой кислот будет получаться совершенно различное количество отщепляемого водорода радикала. Половина моля фумаровой кислоты дает при распаде два водорода радикала, а половина моля янтарной кислоты — четыре. Если бы фиксация шла пропорционально водороду радикала, то на янтарной кислоте должно было фиксироваться по крайней мере в два раза больше азота, чем на фумаровой кислоте. На самом же деле получаются иные величины: на янтарной кислоте фиксируется на 1 г водорода радикала 216 мг азота, а на фумаровой кислоте 244 мг, т. е. даже больше, чем на янтарной. Значит, фиксация атмосферного азота и на этих кислотах идет вне всякой связи с водородом радикала.

Если учитывать механизм мобилизации водорода яблочной и фумаровой кислот, то легко установить, что они дают одинаковое количество водорода радикала. И это вполне понятно, так как фумаровая кислота легко переходит в яблочную за счет присоединения воды под влиянием фермента фумаразы. Поэтому самый принцип расчета фиксации на фумаровой кислоте на два водорода радикала, а на яблочной кислоте — на три противоречит фактическому положению дела и является недопустимым. Если внимательно ознакомиться с приведенными нами цифрами, то легко убедиться, что в таком расчете и вообще

нет надобности. На обеих этих кислотах азотобактер фиксирует (на 1 к-кал.) совершенно одинаковое количество азота (на яблочной 1,50 мг, на фумаровой — 1,53 мг). Никакого отношения, равного 2 : 3, как это должно было бы получиться при специфическом участии водорода радикала, не получается. Азотобактер делает свою работу в предельно точном соответствии с механизмом мобилизации водорода и вне всякой связи с водородом радикала. Только внимательное знакомство с нашей работой позволяет понять, какую замечательную особенность организма нам удалось вскрыть упомянутыми выше опытами.

Еще более эффективные результаты получаются, когда мы будем внимательно рассматривать ход мобилизации водорода этилового спирта. Он может быть представлен следующей схемой:



При использовании этилового спирта отщепляется три водорода радикала еще до перехода его в уксусную кислоту да пять водородов радикала при окислении укусусной кислоты до углекислоты. Согласно предлагаемой закономерности, на этиловом спирте должно было бы фиксироваться в $1^1/_2$ раза больше азота, чем на уксусной кислоте. На самом же деле фиксируется в 2 раза меньше, чем на уксусной кислоте. Аналогичные результаты получаются и при рассмотрении азотфиксации на пропиловом спирте.

Так как до перехода пропилового спирта в пропионовую кислоту освобождается также три водорода радикала, то на нем должно было бы фиксироваться гораздо больше азота атмосферы, чем на пропионовой кислоте. А между тем мы имеем обратную картину. На пропиловом спирте фиксируется меньше азота, чем на пропионовой кислоте.

Мы особенно подчеркиваем эту сторону дела, так как Гапон считает, что радикалы, насыщенные водородом, трудно окисляются. Переход пропилового спирта в пропионовую кислоту или этилового спирта в уксусную кислоту осуществляется с необычайной легкостью. Пиридиновая дегидраза без всяких трудностей снимает два водорода у углерода, имеющего гидроксильную группу, и превращает спирт в альдегид. С такой же легкостью эта дегидраза снимает два водорода из гидрата альдегида и превращает его в соответствующую кислоту. В получающихся кислотах остается однотипный радикал со спиртами. Значит, окисление спирта отличается от окисления соответствующей ему кислоты только дополнительным отщеплением нескольких водородов радикала. Если бы предположение о специфической роли водорода хоть в какой-либо мере отвечало действительности, то на спиртах должно было бы фиксироваться несравненно больше азота, чем на образовавшихся из них кислотах. А между тем на них фиксируется в несколько раз меньше. Из этого следует, что фиксация азота на спиртах противоречит отстаиваемой Гапоном закономерности. К этому можно добавить, что при указанном ходе мобилизации водорода мы должны были бы иметь на спиртах с бо́льшим молекулярным весом и более высокую продуктивность азотфиксации. На самом же деле имеется обратное соотношение. На пропиловом спирте азотфиксация в два раза ниже, чем на этиловом, а на последнем — в два раза ниже, чем на глюкозе (при расчете на 1 к-кал. запаса химической энергии), хотя при окислении глюкозы водород радикала составляет только $^1/_3$ от отщепляемого водорода, а на спирте — более $^2/_3$.

Но и этого мало. Добавление спирта в раствор с глюкозой, где фиксация азота совершается за счет водорода глюкозы, понижает продуктивность этого процесса с совершенно определенной закономерностью: чем больше молекулярный вес добавленного спирта, тем сильнее он подавляет и азотфиксацию на глюкозе. При переходе от одного члена гомологического ряда к другому сила угнетающего действия спиртов возрастает в два раза, давая ряд Траубе, хотя и с другим коэффициентом. Если мы учтем, что пропиловый спирт, хотя и потребляется азотобактером как источник углерода с половинной эффективностью для азотфиксации, но при введении в среду с глюкозой все равно закономерно понижает эффективность азотфиксации на глюкозе в два раза, то у нас не останется иной возможности объяснить наблюдаемые явления, кроме допущения, что спирты влияют на этот процесс своей поверхностной активностью. Если бы предположение Гапона, что меньшая эффективность азотфиксации на спиртах зависит лишь от трудности окисления насыщенного водородом радикала хоть в какой-либо мере было верно, то трудно окисляющийся пропиловый спирт (нормальный и изо-пропиловый) должен бы остаться в растворе нетронутым и никак не мог бы повлиять на азотфиксацию за счет глюкозы. А между тем он не просто остается в растворе не тронутым азотобактером, а подавляет азотфиксацию на глюкозе в два раза при концентрации в 0,2 моля. При чем же здесь трудное окисление насыщенного водородом радикала спирта? Эта особенность отношения азотобактера к спиртам не была никем замечена до сих пор только потому, что исследователи мало прибегали к количественным определениям фиксированного азота на определенное количество использованного спирта. Достаточно нам было ввести в физиологические исследования азотобактера элемент количественных определений, как открытие закономерности, связанной с отрицательным влиянием спиртов на азотфиксацию, стало совершенно неизбежным.

Наконец, если бы дело было связано с трудностью окисления насыщенного водородом углеродистого радикала, то как могла бы итти азотфиксация на пропионовой, масляной и даже валериановой кислотах. Масляная кислота имеет три углеродных атома, насыщенных водородом ($CH_3 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot COOH$), и все же азотобактер использует ее для выполнения процесса азотфиксации не менее продуктивно, чем глюкозу. На 1 к-кал. запаса химической энергии на глюкозе фиксируется 2,1 мг атмосферного азота, а на масляной кислоте — 1,8 мг. На 1 г водорода радикала в первом случае фиксируется 211 мг, а во втором — 247 мг азота. При чем же здесь трудность окисления насыщенного водородом радикала? Азотобактер легко выполняет этот процесс и фиксирует азот атмосферы в полном соответствии с нашим объяснением и вне всякой связи с водородом радикала.

Против предположения о специфическом участии водорода радикала в азотфиксации говорят также и данные по интенсивности этого процесса на бензойной кислоте. Это соединение окисляется азотобактером таким же образом, как и плесневыми грибами, по отношению к которым Буткевичем было показано, что бензольное кольцо разрывается на три молекулы щавелевой кислоты. При этом разрыве водород радикала переходит в водород карбоксила щавелевой кислоты. Если бы в фиксации атмосферного азота действительно участвовал только водород радикала, то на бензойной кислоте этот процесс был бы совершенно невозможным. Однако наши данные показывают, что на этом соединении азотобактер прекрасно развивается и фиксирует столько же атмосферного азота на 1 к-кал. запаса химической энергии, сколько и на глюкозе. Таким образом, выходит, что все наши данные с культурой азотобактера и все данные современной биохимии говорят против предположения о специфическом участии водорода

радикала в фиксации атомсферного азота азотобактером. Для того чтобы эту закономерность принять, нужно не только игнорировать все экспериментальные данные, полученные в наших опытах, но и отбросить как заблуждение все данные современной биохимии.

Наконец, против специфического участия водорода радикала в фиксации атмосферного азота азотобактером говорят еще и наши данные [6] по влиянию на фиксацию о-динитробензола, использованного нами в качестве вещества, необратимо акцептирующего водород. При помощи этого акцептора нам удалось осуществить опыты в бескислородной среде и угнать из глюкозы более 95% всего водорода. Если бы в фиксации участвовал водород радикала, то при таком почти полном отвлечении водорода к о-динитробензолу фиксация должна бы понизиться или же полностью прекратиться. А между тем азотобактер и в этих условиях массового угона водорода к другому акцептору продолжает расти (число клеток возрастает на $2{,}75 \cdot 10^{10}$) и интенсивно фиксировать азот атмосферы, давая даже бо́льшую продуктивность, чем в том случае, когда акцептором водорода служит молекулярный кислород. Эти данные полностью замыкают цепь экспериментальных доказательств, показывающих неприемлемость мнения, что водород, связанный с углеродным атомом, принимает специфическое участие в фиксации азота или же в других биохимических процессах. Поэтому, подводя итог обзору экспериментальных данных, мы должны признать, что водород радикала никакого специфического участия в фиксации азота атмосферы не принимает и принимать не может.

В связи с этим невольно вспоминаются классические слова Энгельса: «Физиология есть, разумеется, физика и в особенности химия живого тела, но вместе с тем она перестает быть специально химией: с одной стороны, сфера ее действия здесь ограничивается, но, с другой стороны, она поднимается на высшую ступень» [7].

Современное развитие физиологии бесспорно показало, сколь глубоко проникновенными были эти бессмертные слова.

Из изложенного следует, что наша формулировка, связывавшая интенсивность фиксации азота атмосферы азотобактером с состоянием окисляемого вещества, остается в полной силе.

Московская сельскохозяйственная академия
им. К. А. Тимирязева

*Получено 1.X 1947*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Гапон Е. Н. О механизме фиксации азота атмосферы азотобактером. Микробиология, т. XVI, вып. 3, стр. 204, 1947.
2. Оппенгеймер К. Химическая динамика жизненных процессов, ОНТИ, стр. 304, 1934. М.—Л.
3. Федоров М. В. Продуктивность азотфиксации на разных источниках углерода. Микробиология, т. XIV, вып. 2, стр. 94, 1945.
4. Федоров М. В. К вопросу о химизме фиксации азота атмосферы азотобактером. Доклады Научной конференции ТСХА в 1944 г., вып. 1, стр. 96, 1945.
5. Федоров М. В. Влияние на фиксацию азота атмосферы азотобактером веществ, угнетающих процессы гликолиза. ДАН СССР, т. LV, № 3, 1947.
6. Федоров М. В. Фиксация атмосферного азота азотобактером в присутствии ортодинитробензола в качестве акцептора водорода. ДАН СССР, т. LV, вып. 1, стр. 57, 1947.
7. Энгельс Ф. Диалектика природы, Партиздат, стр. 110, 1932, М.—Л.

# ОБ АРТЕФАКТАХ, ПРИНЯТЫХ ЗА ЯДРА У БАКТЕРИЙ

*А. А. Имшенецкий*

Строение бактериальной клетки интересует не только микробиологов. Цитологические исследования бактерий привлекают внимание цитогенетиков, протозоологов и всех биологов, интересующихся эволюцией клетки. Возможно, ли изучая современные одноклеточные существа, установить пути эволюции клеточного ядра? В чем особенности изменчивости и наследственности у организмов, лишенных ядра и хромозом? Значение этих вопросов выходит далеко за пределы чисто микробиологических интересов.

В последние годы появились прекрасные цитологические исследования по строению хромозом у высших растений и начала бурно развиваться генетика микроорганизмов, в частности, опубликован ряд прекрасных работ по изменчивости и наследственности главным образом сумчатых грибов. Все это не могло не оживить вопроса о ядерном аппарате у бактерий. Были применены такие новые методы исследования, как реакция Фейльгена, электронная и фазово-контрастная микроскопия, а также другие методы, но они пока не дали ничего принципиально нового о ядре у бактерий. Попрежнему наиболее убедительной остается теория диффузного ядра, считающая, что у бактерий уже произошло образование нуклеопротеидов, специфичных для ядра, но морфологическое обособление ядра у истинных бактерий (Eubacteriales) еще не наступило.

Периодически появляющиеся сообщения о существовании у бактерий настоящих ядер или хромозом не являются чем-то новым, так как на протяжении шестидесяти лет такие работы публикуются ежегодно, но в дальнейшем, не получая подтверждения, они забываются. При анализе фактического материала, приводимого в работах исследователей, доказывающих существование у бактерий морфологически обособленного ядра, всегда можно найти источник ошибки и установить, что́ именно по недоразумению принято автором за ядро. В одних случаях причину заблуждения обнаружить легко, в других приходится затратить много усилий, чтобы выяснить, на каком этапе работы допущена неточность.

В этой статье описана история одной ошибки, в которую впали некоторые исследователи, изучая цитологию бактерий. Изложению экспериментальных данных должны предшествовать краткие сведения о полярных зернах, содержащихся в бактериальной клетке.

Перехожу к описанию этих структур.

## Полярные зерна

Хромофильные зерна, располагающиеся на концах бактериальных клеток, относятся к наиболее постоянным и хорошо известным структурам. Очень многие исследователи обнаруживали их в бактериальных клетках, и еще в прошлом столетии были сделаны прекрасные микрофотографии клеток неспороносных бактерий, содержащих полярные зерна. Один из таких снимков, принадлежащий Migula [6], воспроизведен на рис. 1.

Мне уже неоднократно приходилось давать характеристику полярным зернам [1, 2, 3], и в этой статье я остановлюсь только на тех особенностях телец, которые имеют непосредственное отношение к вопросу о ядре у бактерий.

Для краткости перечислю эти особенности.

1. Наиболее крупные полярные тельца содержатся в клетках неспороносных бактерий, в частности у таких видов, как Bact. coli, Bact. prodigiosum, Proteus vulgaris и др. Они мельче по величине, но их также легко обнаружить в клетках спороносных бактерий, спирилл, миксобактерий. Полярные тельца характерны для клеток, имеющих цилиндрическую форму, так как у кокков они отсутствуют. Таким образом, это наиболее распространенные структуры у бактерий, и они обнаруживаются во все фазы их онтогенетического развития.

2. Тельца, располагающиеся на полюсах, плотнее, чем остальные участки протоплазмы, поэтому в живых клетках они преломляют свет, а в окрашенных препаратах хромофильны. В молодых коротких клетках тельца крупнее, чем в более старых удлиненных бактериях.

3. Назначение телец окончательно не выяснено; можно предполагать, что они несут опорную функцию.

4. Полярные зерна ничего общего с ядром не имеют. Биполярную зернистость нельзя рассматривать как ядра по ряду причин. Во-первых, из-за их постоянной локализации на полюсах клетки, во-вторых, вследствие присутствия в одной клетке всегда двух телец, в-третьих, потому, что они никогда не делятся, в-четвертых, следует отметить, что у высших бактерий, например некоторых миксобактерий, в клетках наряду с обособленным в морфологическом отношении ядром имеются и полярные тельца. В огромной литературе, посвященной цитологии бактерий, можно найти не более 2—3 работ, в которых включения, расположенные на полюсах клеток, трактовались бы как ядра. К этим работам относятся, между прочим, исследования Enderlein, который считал полярные зерна за два ядра и называл бактерии с биполярной зернистостью «димихитами». Сейчас теория циклогении Enderlein и его цитологические исследования вполне заслуженно забыты.

## Набухание бактериальных клеток и полярных зерен

В 1942 г. появилась в печати работа Robinow [7], посвященная цитологии бактерий. В ней сообщалось, что в бактериальной клетке имеется крупное ядро, которое затем делится, и это приводит к появлению в бактериальной клетке двух ядер. Эта работа привлекла большое внимание, но не встретила должной критической оценки. Исходя из работ Robinow [7, 8], эти исследования у нас в СССР повторил Пешков [4, 5] и пришел к аналогичным результатам.

Исключительные по своему качеству микрофотографии, приведенные в работе Robinow [7, 8], не могли не произвести впечатления — в каждой клетке были отчетливо видимы крупные зерна. В коротких особях имелось одно хромофильное тельце. В более длинных клетках содержалось два зерна, которые автор считал дочерними ядрами, расходящимися после деления одного материнского ядра, лежавшего в центре клетки. Представление о клетках с одним или двумя зернами дает рис. 2, на котором изображена одна из иллюстраций Robinow.

В своих исследованиях я строго придерживался методики Robinow, но обратил особенное внимание на критический анализ микроскопических картин и значение отдельных методических операций.

## Методика

Цитологические исследования были проведены с молодыми клетками Bact. coli. Для получения молодых культур применялась следующая

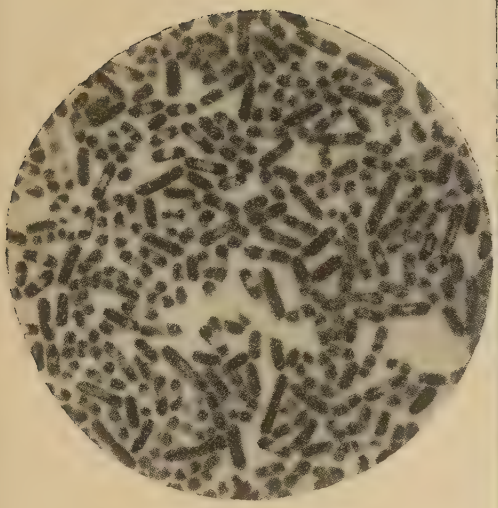
методика. Из 18-часовой культуры Bact. coli, выросшей на скошенном МПА, в пробирке приготовлялась взвесь клеток в воде. Густота взвеси соответствовала стандарту, применяемому для приготовления вакцин (1,5 млрд. клеток в 1 $см^3$). Одна десятая часть 1 $см^3$ этой взвеси наносилась на поверхность МПА в чашках Петри и размазывалась шпателем. Чашки помещались в термостат при 37°. Через 45; 60; 90 минут и 3 часа приготовлялись препараты из клеток, находившихся в одной и той же чашке. Для этого в агаре каждый раз вырезался квадратный кусочек размером 8 мм × 8 мм. К этому кусочку прикладывалось покровное стекло и таким образом получался препарат-отпечаток, который затем фиксировался парами осмиевой кислоты в течение трех минут. Контролем служили препараты, приготовляемые непосредственно из посевного материала, т. е. из 18-часовой культуры Bact. coli. Фиксированные препараты делились на две партии. Одна из них быстро окрашивалась непосредственно вслед за фиксацией. Окрашивание производилось метиленовой синью (1 : 1 000) или краской Гимза в течение 1—5 минут. Другая партия препаратов помещалась в краску Гимза на 24 часа, а затем дифференцировалась 60° спиртом 2—3 минуты. Затем препараты докрашивались водным раствором лихтгрюна (0,25%). Окрашенные препараты заделывались в канадский бальзам. Для приготовления краски Гимза смешивались 1 часть раствора эозина 1 : 1 000, 3 части воды и 2 части раствора азура той же концентрации. Дистиллированная вода, в которой производилось растворение красок, имела реакцию pH 7,2.

### Общая характеристика микроскопических картин

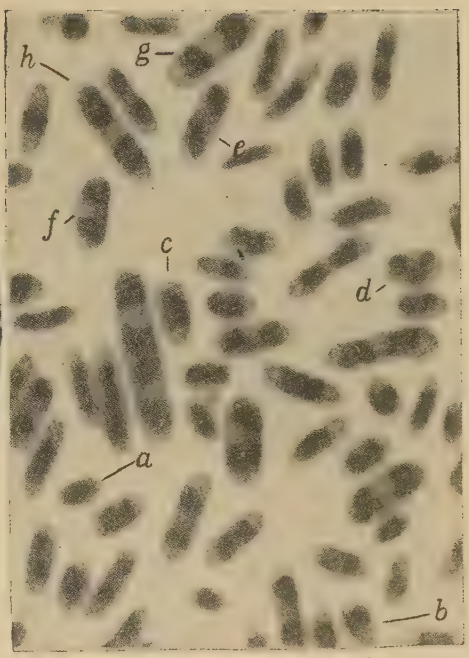
В препаратах, приготовленных из 18-часовой культуры, клетки имеют вид, хорошо известный всем микробиологам. Окрашивая препарат в течение короткого времени метиленовой синью или краской Гимза, легко убедиться в том, что клетки Bact. coli цилиндрической формы и в каждой из них имеется два полярных зерна, окрашенных в более темный цвет, чем остальные участки клетки. Полярные зерна постоянно располагаются на полюсах, где они вплотную прилегают к оболочке клетки. Представление о морфологии клеток Bact. coli из 18-часовой культуры дает рис. 3.

Если клетки Bact. coli из 18-часовой культуры перенести на поверхность МПА, т. е. произвести посев так, как это указано в методике, то вскоре их морфология становится иной. Как известно, бактерии в очень молодых культурах, т. е. вскоре после посева, увеличиваются в своих размерах. В двух-, трехчасовой культуре Bact. coli клетки значительно крупнее, чем в 18-часовой. Попадая на поверхность свежей среды, клетки воспринимают воду, набухают и их объем увеличивается. Повидимому, очень скоро к этому присоединяется увеличение массы бактериальной клетки за счет пластических процессов. Таким образом, процесс роста молодых клеток связан как с увеличением содержания воды в клетке, так и с ассимиляцией необходимых питательных веществ. Расчленить эти два процесса невозможно.

Молодые клетки Bact. coli, т. е. взятые из культур 45-, 60- или 90-минутного возраста, окрашивались быстро метиленовой синью или краской Гимза в течение 1—5 минут. Микроскопия препаратов, подвергнутых быстрой окраске, выясняет, что в течение такого незначительного срока клетки стали значительно крупнее. Они слегка раздуты, не всегда правильной цилиндрической формы, иногда дугообразно изогнуты, как это видно из рис. 4. Содержимое клеток окрашивается в гораздо более бледный цвет, чем у клеток, взятых из 18-часовой культуры, т. е. в посевном материале. Такое менее интенсивное окрашивание, несомненно, стоит в связи с поступлением воды внутрь клетки

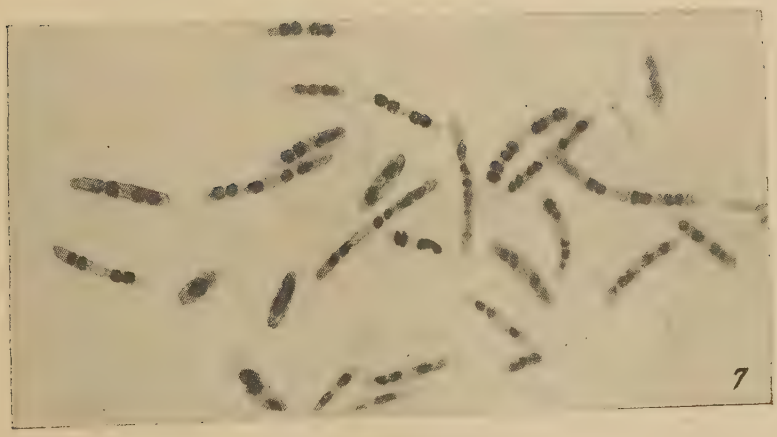


1




2

6



7

Рис. 1. Полярные зерна в клетках Bact. typhi (по Migula, 1897)

Рис. 2. «Хроматиновые структуры» в молодых клетках Bact. coli (по Robinow, 1944)

Рис. 6. Молодые клетки Bact. coli (60-минутная культура) после длительной окраски по Гимза. Зерна на полюсах под влиянием окраски увеличились в размерах, отошли от полюсов и приблизились друг к другу

Рис. 7. Клетки B. coli из 90-минутной культуры, окрашенные по Гимза. Продолжительность окраски 24 часа. Набухшие полярные зерна находятся в средней трети клетки

и ее набуханием. В бледно окрашенных клетках постоянно обнаруживаются более темные полярные зерна, которые всегда располагаются на концах клеток и тесно прилегают к ее оболочке (рис. 4). Величина

Рис. 3. Клетки Bact. coli из 18-часовой культуры. Темноокрашенные зерна на полюсах (быстрое окрашивание по Гимза)

Рис. 4. Набухшие клетки Bact. coli с полярными зернами из 60-минутной культуры (кратковременное окрашивание по Гимза)

Рис. 5. Клетки Bact. coli из 60-минутной культуры, но после пребывания в краске Гимза в течение 24 часов. Полярные зерна набухли и переместились в среднюю часть клетки (посмертные изменения)

зерен такая же, как в клетках, взятых из 18-часовой культуры. Следовательно, в молодых клетках набухания полярных зерен не происходит. Существенно, что увеличение размеров клетки не отражается на локализации зерен — они попрежнему остаются на полюсах. Это обстоятельство необходимо подчеркнуть, как имеющее важное значение.

Если препараты, приготовленные из культуры того же возраста (например, одночасовой), не окрашивать сразу, а поместить в раствор

краски Гимза на 24 часа, то мы увидим в препарате совершенно иные микроскопические картины.

После пребывания в краске Гимза клетки еще более увеличиваются в своих размерах, т. е. подвергаются посмертному набуханию. Полярные зерна также становятся больше, отходят от полюсов и сближаются друг с другом. Это приводит к тому, что на полюсах клеток уже нет зерен, а они располагаются ближе к центру бактериальной клетки. Локализация зерен может быть самой различной. В коротких клетках зерна должны проделать меньший путь для того, чтобы стать рядом,

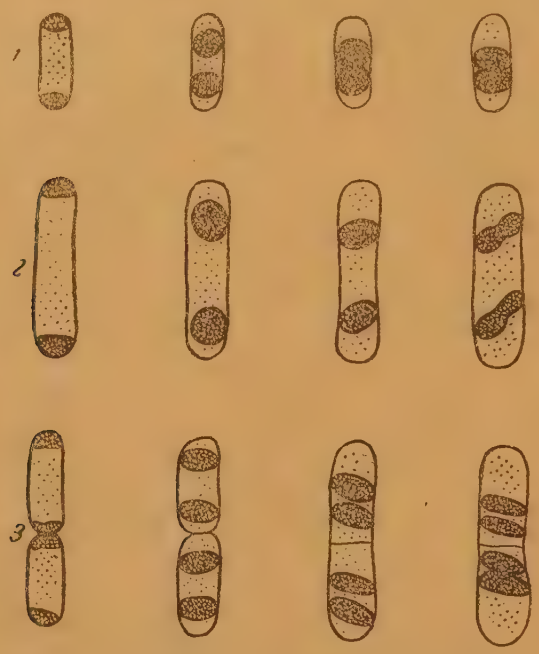



Рис. 8. Последовательные стадии перемещения полярных зерен при набухании клеток в краске Гимза:

*1* — сближение зерен в коротких клетках; *2* — отхождение зерен от полюсов в длинных клетках; *3* — набухание и перемещение полярных зерен в двух молодых соединенных друг с другом клетках (схематично)

чем в более длинных бактериальных клетках (рис. 5, 6, 7, 8). Поэтому у небольших бактерий обычно зерна расположены ближе друг к другу. Нередко они настолько сближаются, что создается впечатление, как будто в клетке имеется только одно зерно (рис. 5, 6, 7, 8). В действительности же при более тщательной микроскопии видно, что это более крупное включение состоит из двух половинок, т. е. двух сблизившихся полярных зерен (рис. 5, 6, 7, 8).

При набухании наиболее длинных клеток зерна также устремляются к центру, но обычно они только приближаются друг к другу, но не соприкасаются. Поэтому у длинных бактерий обнаруживаются два зерна, имеющие различную локализацию, как это видно на рис. 5, 6, 7, 8.

Если в препарате имеются клетки, располагающиеся попарно, то в каждой из них обнаруживается по два зерна, отошедших от полюсов и переместившихся в среднюю треть клетки. В такой удлиненной, состоящей из двух клеток палочковидной форме содержится четыре зерна (рис. 5, 6, 7, 8).

Таким образом, в зависимости от формы и величины клетки, попавшей из 18-часовой культуры на чашку Петри, а затем в краску Гимза, микроскопические картины могут быть различными. В коротких клетках зерна легче перемещаются к центру, чем в длинных, в цепочке клеток будет 4, 6 или 8 зерен в зависимости от числа клеток, составляющих цепочку, и т. д. Однако есть нечто общее, объединяющее все эти формы,— это полное отсутствие в клетках полярных зерен на обычных местах, т. е. на концах клеток.

Как уже указывалось, клетки Bact. coli, попадая на поверхность агара, увеличиваются в своих размерах. Соответствующие измерения клеток дали следующие результаты.

Размер клеток Bact. coli из 18-часовой культуры 0,5—0,6 $\mu \times 2{,}2$—3,0 $\mu$
» » » из 60-минутной культуры 0,7—1,0 $\mu \times 1{,}8$—3,2 $\mu$
» » » из 60-минутной культуры после 24-часового пребывания в краске Гимза 0,9—1,4 $\mu \times 2{,}8$—5,0 $\mu$

Необходимо отметить, что не все клетки в препарате набухают в одинаковой степени. Одни из них находятся в начальных стадиях набухания, у других морфологические изменения зашли значительно дальше — в них зерна крупнее, клетки шире и т. д. Поэтому микроскопические картины в препаратах не однородные.

Все эти опыты не оставляют никаких сомнений в том, что если из клеток Bact. coli, взятых из одночасовой культуры, приготовить препараты, зафиксировать одним и тем же способом и окрасить одной и той же краской Гимза, то можно получить совершенно различные результаты в зависимости от продолжительности окраски. Быстрое окрашивание дает обычную морфологию клеток — на концах каждой бактерии имеются полярные зерна. Если убитые фиксированные клетки продержать долго в краске Гимза, то клетки и полярные зерна набухнут, зерна отойдут от полюсов и могут быть обнаружены в средней трети клеток. Следовательно, перемещение зерен в клетке — явление посмертное, вызванное чисто физическими изменениями, происходящими в убитой клетке.

### Влияние фиксации и окраски

Быстрое окрашивание препаратов убеждало в том, что смещение полярных телец в клетке происходит во время пребывания препаратов в краске Гимза. Следовательно, у бактерий происходит набухание протоплазмы после их фиксации. В связи с этим возникал вопрос о том, имеет ли значение характер фиксатора. Для выяснения этого вопроса клетки Bact. coli из культуры одночасового возраста были зафиксированы параллельно: фиксатором Карнуа, парами осмиевой кислоты и парами формалина. Фиксированные препараты были затем помещены в краску Гимза на 24 часа. Микроскопические картины во всех препаратах оказались одинаковыми — всюду произошло смещение полярных зерен к центру клетки. Следовательно, характер фиксатора роли не играет и стало очевидным, что содержимое бактериальных клеток, несмотря на фиксацию, способно к набуханию.

Далее выяснялось влияние различных красок. Препараты с клетками из одночасовой культуры были помещены в растворы различных красок: железный гематоксилин (по Гайденгайну), метиленовую синь (1 : 1 000), лихтгрюн (0,25%), азур (2 : 1 000), эозин (1 : 1 000). Контролем служили препараты, помещенные в раствор краски Гимза также на 24 часа. При этом оказалось, что во всех случаях полярные зерна оставались на полюсах бактерий. Только при окраске по Гимза зерна и клетки набухали и полярные зерна отошли от полюсов клеток. Таким образом, ни кислые, ни основные краски отдельно не вызывают посмертного набухания клеток. Сочетание же азура и эозина (т. е.

краски Гимза) вызывает отхождение телец от полюсов и интенсивное набухание и окрашивание зерен.

Микроскопируя препараты, окрашенные в течение 24 часов, мы видим только конечные изменения. Несомненный интерес представляло изменение сроков окраски. Поэтому препараты из 60-минутной культуры окрашивались по Гимза в течение различных сроков. При этом были получены следующие результаты.

| Продолжительность окраски Bact. coli | Микроскопическая картина |
|---|---|
| 3 минуты . . . . . | Клетки и зерна в размерах не увеличились; зерна на полюсах |
| 1 час . . . . . | То же |
| 2,5 часа . . . . . | Только у части клеток заметно отхождение полярных зерен от полюсов |
| 3 часа . . . . . | То же |
| 5 часов . . . . . | Многие клетки сильно набухли, и все зерна переместились в среднюю треть клетки |
| 6 » . . . . . | То же |
| 24 часа . . . . . | Как правило, все зерна смещены и стали ближе к центру клетки |

Мы видим, что, вариируя сроки окраски, можно постепенно следить за характером изменений и получить представления о динамике перемещения зерен. Вначале они все на полюсах, затем у части клеток они отходят от концов клеток, и, наконец, уже у большинства бактерий зерна набухли и отошли к центру. Между сроком действия краски и степенью набухания зерен имеется прямая зависимость. Чем дольше находятся препараты в краске Гимза, тем сильнее изменяются клетки и смещаются зерна.

### Морфология смещенных полярных зерен

У клеток Bact. coli, находившихся в течение 60 минут на поверхности агара, тельца имеют полушаровидную форму и небольшие размеры, обычно 0,2—0,4 μ (рис. 4). В клетках, которые находились в краске Гимза и набухли, зерна также набухают и при этом приобретают круглую форму. Они становятся значительно крупнее и интенсивно окрашиваются в фиолетовый цвет (рис. 5, 6, 7). По мере дальнейшего увеличения размеров клетки зерна также увеличиваются, но окрашиваются уже бледнее, что подтверждает их набухание. Иногда диаметр увеличенных зерен достигает 1,4—1,8 μ. При очень сильном увеличении поперечника клеток зерна превращаются сначала в тельца овальной, а затем бисквитообразной или палочковидной формы (рис. 5, 8). Такое изменение формы, повидимому, связано с продолжающимся поступлением воды в клетку, приводящим к ее вздутию. В местах соприкосновения зерен с оболочкой клетки, очевидно, имеется некоторая связь. Клетка, раздуваясь, «растягивает» шаровидное зерно, которое постепенно превращается в палочковидную структуру или гантелевидное тельце (рис. 5, 8). Такой механизм образования палочковидных телец подтверждается тем, что они обнаруживаются только в самых толстых клетках, содержимое которых окрашено очень бледно. Более тонкие клетки всегда содержат шаровидные зерна. Серьезного значения все эти изменения, конечно, не имеют, так как все они происходят после фиксации во время пребывания препаратов в краске Гимза.

### Неравномерное набухание клетки

Клетки Bact. coli, находясь в растворе краски Гимза, подвергаются изменениям, характер которых только подтверждает их искусственное посмертное происхождение. Обогащаясь водой, они очень часто набу-

хают неравномерно и утрачивают при этом правильную палочковидную форму. Проникновение воды в клетку происходит, как и следовало ожидать, особенно интенсивно на их концах. Если одновременно набухают оба полюса, то клетка приобретает форму бисквита. В этом случае бледные раздутые концы клеток окрашены лихтгрюном в светлозеленый цвет, а полярные зерна, благодаря набуханию их концов, смещаются в среднюю треть клеток (рис. 9, *a*). Так как средняя часть

Рис. 9. Неравномерное набухание клеток Bact. coli, происходящее в фиксированных препаратах при длительной их окраске по Гимза:

*a* — „бисквитообразные" клетки с раздутыми концами; полярные зерна смещены в узкую среднюю часть клетки. Микроскопические картины имитируют деление бактерий; *b* — каплевидные или клиновидные клетки, возникающие благодаря более сильному набуханию одного из концов клеток; *c* — у парно расположенных клеток зерна перемещаются к перегородке, имеющейся между клетками; *d* — то же, но зерна тесно прилегают друг к другу

клетки набухает меньше, она у́же, чем концы. Иногда один из концов клетки набухает гораздо сильнее, чем другой. В этом случае бактерии приобретают клиновидную или каплевидную форму, а полярное зерно из более набухшего конца оттесняется к менее раздутому концу. Оба зерна оказываются вблизи узкого, более тонкого конца клетки (рис. 9, *b*). Интересно, что зерно, находящееся ближе к сильно набухшему концу клетки, само по понятным причинам набухает сильнее и поэтому оно гораздо крупнее, чем другое полярное зерно, находящееся у более тонкого конца клетки (рис. 9, *b*). Проникновение воды в две соединенные друг с другом клетки может привести к возникновению весьма своеобразной микроскопической картины. Периферические, т. е. свободные, концы каждой из клеток сильно набухают, и в результате полярные зерна смещаются к соприкасающимся концам клеток (рис. 8, 9, *c*). Если за этим следует набухание зерен, то сблизившиеся четыре зерна имеют вид почти сплошной темноокрашенной массы (рис. 9, *d*).

Таким образом, все разнообразие структуры бактериальных клеток объясняется только неодинаковой степенью набухания различных участков клетки. В препаратах, быстро окрашенных по Гимза, нет ни бисквитообразных, ни каплевидных, ни других форм. Следовательно, все эти изменения носят характер артефакта.

При известной фантазии можно из этих посмертных изменений формы клеток и перемещений зерен реконструировать деление клеток перетяжкой, деление и расхождение «ядер» и т. п. Это «деление ядер»

подробно описано в работах Robinow, а также Пешкова. Так как такое «деление ядер» происходит у мертвых клеток, то нет основания проявлять к нему интерес.

## Заключение

Применение сравнительного метода при изучении цитологии микробов выяснило, что наиболее общей особенностью строения самых различных бактерий следует считать существование в их клетках полярных зерен. Нахождение двух хромофильных телец на полюсах клетки и возникновение de novo двух телец при делении бактерий настолько мало соответствует нашим представлениям о ядре, что авторов, считающих полярные тельца ядрами, почти не существует. Такое отношение к зернам объясняется главным образом их локализацией, которая не меняется во все фазы онтогенетического развития бактерий. Зерна постоянно находятся на конце клеток. Заранее можно было ожидать, что если бы удалось искусственно изменить локализацию зерен, т. е. вызвать их перемещение в клетке, то нахождение хромофильных телец в средней трети клетки сейчас же дало бы возможность утверждать, что у бактерий имеются ядра. Для того чтобы такое смещение зерен происходило во всех клетках, необходимо было воздействовать определенным внешним фактором на измененных бактерий, находящихся в таком состоянии, когда перемещение зерен стало бы возможным. Оказалось, что такое состояние бактериальных клеток наблюдается в очень молодых культурах не старше двух-трех часов. В этот самый начальный период роста культуры проницаемость оболочки и протоплазмы клеток резко изменяется, клетки увеличиваются в своих размерах, набухают и окрашиваются бледнее. Существенно, что как бы ни увеличивались в своих размерах бактерии в молодом возрасте, локализация полярных зерен остается та же — они плотно прилегают к оболочке клеток на полюсах. В этом можно убедиться, изучая не только фиксированные и окрашенные, но и живые клетки. Однако изменившаяся проницаемость бактерий сказывается на поведении клеток при их окрашивании. Достаточно пробыть таким мертвым, фиксированным клеткам четыре часа в краске Гимза, чтобы клетки и зерна еще более набухли. Благодаря набуханию клеток полярные зерна отходят от полюсов и перемещаются в среднюю треть клетки.

Вопрос о механизме набухания зерен и клеток пока остается открытым. Можно высказать следующую гипотезу. Фиксатор, применяемый для фиксации препаратов, «снимается» в дальнейшем краской, обладающей бо́льшим сродством к аминогруппам, чем фиксатор. Новое соединение обладет повышенной гидрофильностью, и это приводит к набуханию клеточных структур. Дальнейшие эксперименты должны выяснить реальность этой гипотезы.

Впервые с таким посмертным перемещением зерен столкнулся Robinow, затем его данные были подтверждены Пешковым, и оба эти автора ошибочно приняли эти тельца за ядра.

Еще до начала экспериментальных исследований изучение микрофотографий Bact. coli, приведенных в работе Robinow, убедило меня в том, что он имел дело с необычными клетками Bact. coli. На его иллюстрациях клетки Bact. coli значительно крупнее, чем они должны были быть, и они имели вид несколько «раздутых» бактерий. Форма их также совершенно иная, чем у нормальных клеток, нередко они приобретают бисквитообразную, колбасовидную или другую форму. Особенно обращает на себя внимание тот факт, что в клетках Bact. coli, содержащих «ядра», никогда не бывает зерен на полюсах, что так характерно для неспороносных бактерий. В исследованиях Robinow и Пешкова нет

совершенно описания микроскопических картин контрольных препаратов, содержащих молодые клетки, окрашенные сразу без длительного пребывания препаратов в краске. Поэтому самое логичное было предположить, что упомянутые авторы столкнулись с посмертным смещением и набуханием полярных телец в клетках. Описанные в этой работе экспериментальные исследования полностью подтвердили это предположение, и они окончательно выяснили действительную природу «ядер».

При изучении цитологии бактерий нередко вывод о динамике морфологических изменений делается на основании «логической реконструкции». Я подразумеваю расположение клеток, имеющих различное строение, в определенный ряд, который позволяет судить о последовательности происходящих изменений. Выше указывалось, что полярные зерна, сближаясь, соприкасаются друг с другом. Рассматривая этот процесс в обратной последовательности, цитологи сделали вывод о делении «ядра». В действительности же различная локализация зерен, как возникающая в фиксированных препаратах, не имеет никакого отношения к истинному строению бактериальной клетки.

Таким образом, все разнообразие микроскопических картин, обнаруживаемых в препаратах с молодыми клетками Bact. coli при длительной окраске их краской Гимза, объясняется только различной степенью набухания клеток и зерен в растворе красок. В контрольных препаратах, где клетки не набухали в растворе краски, а были окрашены сразу, этих изменений нет. Следовательно, перемещение и набухание зерен представляют собой посмертные изменения, не соответствующие строению живых клеток.

Как известно, всякие изменения, происходящие в клетке под влиянием посмертных химических или физических воздействий, носят название артефактов. Следовательно, крупные шаровидные структуры, описанные Robinow и Пешковым как «ядра» у бактерий, представляют собой артефакт.

## Выводы

1. В клетках Bact. coli независимо от возраста могут быть обнаружены зерна на полюсах. Эти структуры известны давно, и никто их за ядра не считал и не считает.

2. В последние годы появились сообщения (Robinow, Пешков) о ядрах у бактерий. При проверке этих работ установлено, что структуры, принимаемые за ядра, представляют собой полярные зерна, отошедшие от полюсов и переместившиеся в среднюю треть клетки.

3. Отходя от полюсов, зерна сближаются и в коротких клетках соприкасаются друг с другом. Рассматривая отдельные стадии перемещения зерен в обратной последовательности, можно ошибочно притти к выводу о том, что одно зерно делится на два.

4. Перемещение зерен явление посмертное и зависит исключительно от длительного пребывания бактерий в краске Гимза. В этих условиях происходит набухание клеток и полярные зерна изменяют свою локализацию. При быстрой окраске препаратов по Гимза зерна всегда окрашиваются на полюсах клетки.

5. Набухание клеток бывает неравномерным. При вздутии обоих концов клетки возникают бисквитообразные формы, более сильное набухание одного конца придает клетке каплевидную форму и т. п. Все это посмертные изменения, зависящие от физических причин.

6. Проведенные экспериментальные исследования позволяют с полной уверенностью утверждать, что описанные Robinow, а затем Пешковым «ядра» у бактерий представляют собой артефакт.

Институт микробиологии
Академии Наук СССР
Москва

*Получено 29. XI. 1947*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Имшенецкий А. Строение бактерий. Москва, 1940.
2. Имшенецкий А. О ядерном аппарате бактерий. Микробиология, т. XIV, стр. 65, 1945.
3. Имшенецкий А. Несколько замечаний по поводу работы М. А. Пешкова «Кариология цикла развития бактерий Proteus vulgaris Hauser». Микробиология, т. XV, стр. 229, 1946.
4. Пешков М. Цитология и кариология бактерий кишечнотифозной группы. Журн. микроб., эпидем. и иммуноб., вып. 4—5, стр. 3, 1945.
5. Пешков М. О природе «ядер» или так называемых нуклеоидов бактерий. Микробиология, т. XVI, стр. 411, 1947.
6. Migula W. System der Bakterien. 1897, Jena.
7. Robinow C. A study of the nuclear apparatus of bacteria. Proc. Roy. Soc. London, Ser. B., v. 130, p. 299, 1942.
8. Robinow C. Cytological observations on Bact. coli, Proteus vulgaris and various aerobic spore-forming bacteria with special reference to the nuclear structures. J. Hyg., v. 43, p. 413, 1944.

# ЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE PARK WILLIAMS № 8 ПРИ РОСТЕ НА БУЛЬОНЕ

*М. А. Пешков* и *Е. И. Нехотенова*

Целью настоящей работы являлось выяснить ход цитологических изменений Corynebacterium diphtheriae штамма Park Williams № 8 при росте на жидкой среде, в условиях образования токсина.

В первую очередь мы занялись изучением цитологических особенностей этой культуры, так как беглое ее исследование одним из нас несколько лет назад (мазки, любезно предоставленные дифтерийным отделом Казахского института эпидемиологии и микробиологии, 1943 г.) показало почти полную утрату ею способности образовывать волютин.

Для проверки цитологических особенностей была выращена двухсуточная культура Park Williams № 8 на свернутой лошадиной сыворотке.

Мазки, высушенные на воздухе, фиксировались 20 минут жидкостью Карнуа (96° спирта — 6 частей, хлороформа — 3 части, ледяной уксусной кислоты — 1 часть), и затем один и тот же препарат последовательно обрабатывался по Мейеру (или Нейссеру) для выявления волютина; препарат фотографировался. Затем мазок перекрашивался на ядра по методике Пекарского — Робиноу [6] (гидролиз в *N* HCl при 60° в течение 7 минут, окраска по Гимза), причем в процессе гидролиза волютин, если он имелся, надежно удалялся, растворяясь в горячей HCl. Результат также фотографировался. Часть исходного мазка окрашивалась кристалл-виолетом для выявления полного контура палочек.

Рисунок 1 показывает три поля зрения одного и того же мазка, обработанного этими тремя способами.

Как видно из рис. 1 (кадр а), среди неравномерно окрашенных палочек лишь небольшая группа, находящаяся в центре, содержит включения волютина *v*, расположенные полярно. Особенно крупны тельца Бабешь-Эрнста у палочки, видимой слева. Тот же мазок, окрашенный кристалл-виолетом, не выявляет никаких структур. В нижнем кадре представлен результат обработки этого препарата по Пекарскому — Робиноу. Волютин отсутствует, так как растворяется при гидролизе. Во всех особях видны дифференцированные от протоплазмы *pr* ядра *n*.

Следовательно, штамм Park Williams № 8 лишь подтверждает положение (Белозерский [1], Пешков [4, 5]), что волютин или зерна Бабешь-Эрнста в противоположность ядру не должны рассматриваться как конституциональная часть бактериального протопласта. Не вдаваясь в детали цитологического анализа Corynebacterium diphtheriae, что сделано подробно в другой работе (Пешков [4, 5]), в отношении штамма Park Williams № 8 можно сделать тот вывод, что его особи, независимо от среды, на которой они выращены (бульон, свернутая лошадиная сыворотка), всегда содержат оформленные ядерные элементы и изредка гранулы волютина.

В производственных условиях культура выращивалась на среде следующего состава:

| | |
|---|---|
| Сброженная дрожжами мясная вода (аминный азот, которой равнялся 73 мг %) | 1 000 мл |
| Пептон | 2,3 г |
| Уксуснокислый натр | 5 » |
| Хлористый натр | 3 » |
| Уксусная кислота | 0,5 » |
| Глюкоза | 2 » |
| Мальтоза | 3 » |

pH до стерилизации 8,1; резервная кислотность 2,9%; резервная щелочность 3,6%; буферный индекс 6,5.

Среда разливалась в бутылки по 300 мл, а также по пробиркам. Культура высевалась в пробирку с этим бульоном, посев в бутыли производился с данной пробирки. Выращивание велось в термостатной комнате. Для цитологической работы пробы брались из матрасной пробирки, а затем из бутыли на 2, 5, 7, 9, 12, 16 и 20-й день. Одновременно производились выемки для определений pH, Lf, DLM, результаты которых изображены в виде кривых на рис. 2.

Мазки делались из пленки, подсушивались на воздухе, фиксировались 20 минут в жидкости Карнуа и далее обрабатывались по Фёльгену, Пешкову [2, 5] и Пекарскому — Робиноу [6], а также по Мейеру. Окрашенные мазки фотографировались. Как видно из приложенной кривой (рис. 2), токсин начал образовываться на 7-й день, достигая максимума на 12-е сутки. Начиная с 16 суток, количество токсина (DLM) уменьшается в то время, как флокулляционный индекс (Lf) не изменяется.

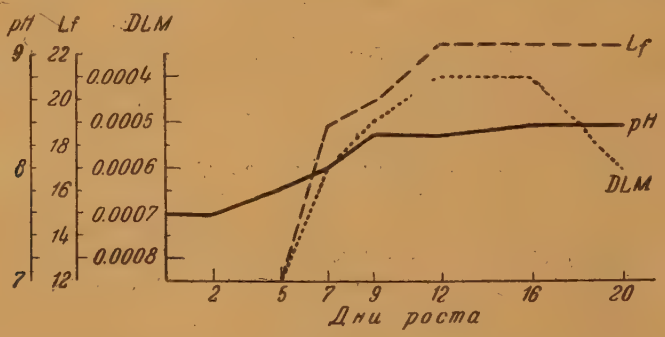



Рис. 2

Ход токсинообразования, флокулляционного индекса и pH при росте на бульоне подопытной культуры Corynebacterium diphtheriae Park Williams № 8

Анализируя цитологическую картину, разыгрывающуюся в популяции в течение ее роста на бульоне, видим (рис. 3, кадр a), что на 2-е сутки особи относительно крупны (особь 1), содержат от 1 до 2 ядерных элементов *n*, погруженных в базофильную цитоплазму *pr*. Подобную же картину можно было наблюдать в посевном материале из матрасной пробирки. Через 7 суток (рис. 3, кадр b) особи, энергично размножаясь, сильно измельчали, сохранив в общих чертах то же цитологическое строение (особь 2 — ядра *n*, протоплазма *pr*). В пленке одноядерные палочки располагаются тяжами. К моменту начала уменьшения количества токсина в культуре, на 16-е сутки, морфология и цитология палочек подверглись резкому и существенному изменению (рис. 3, кадр c). Все особи выросли в длинные многоядерные нити (особь 3; ядро *n*), а протоплазма их приобрела оксифильные свойства. Следовательно, на этой стадии роста культура Park Williams № 8 характеризуется переходом в полиэнергидное состояние, подобно червеобразным подвижным клеткам Proteus (Пешков [3]) или старым бульонным культурам бактерий дизентерийной группы.

## Обсуждение результатов

Настоящее исследование в силу малого числа опытов не претендовало на выяснение полной корреляции между цитологическими изменениями культуры Park Williams № 8 и ходом токсинообразования. Тем не менее полученные данные говорят о том, что по ходу роста культуры на бульоне обнаруживаются, параллельно токсинообразованию, характерные морфо-цитологические изменения культуры, выражающиеся вначале в резком измельчении особей (что в противоположность дру-

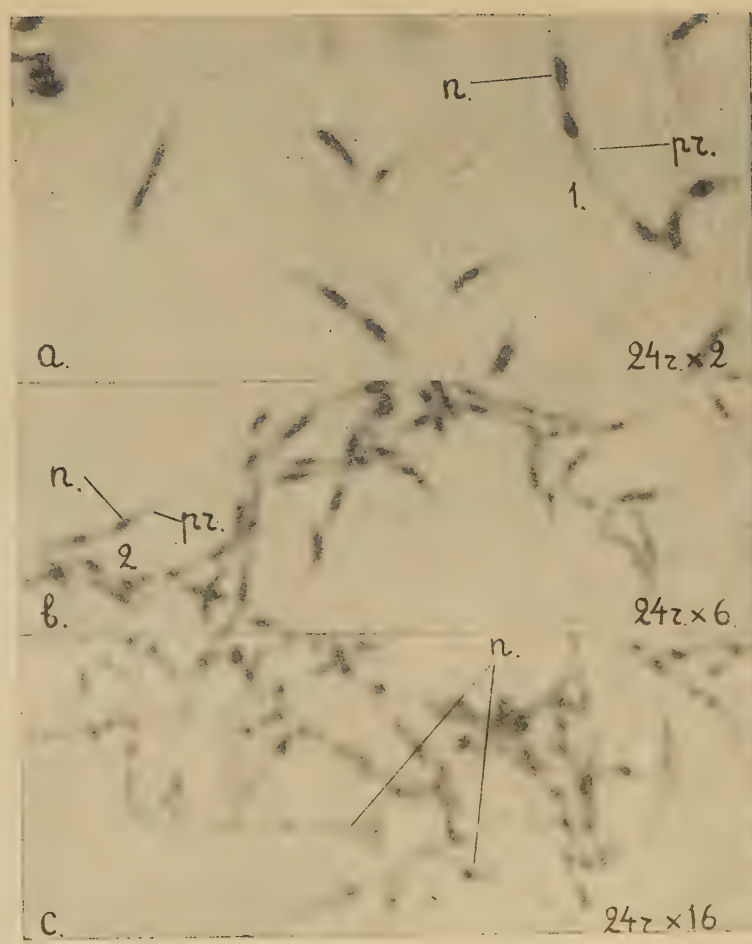

n.
pr.
1.
a.
24r.×2
n.
pr.
2
в.
24r.×6
n.
c.
24r.×16

Рис. 3

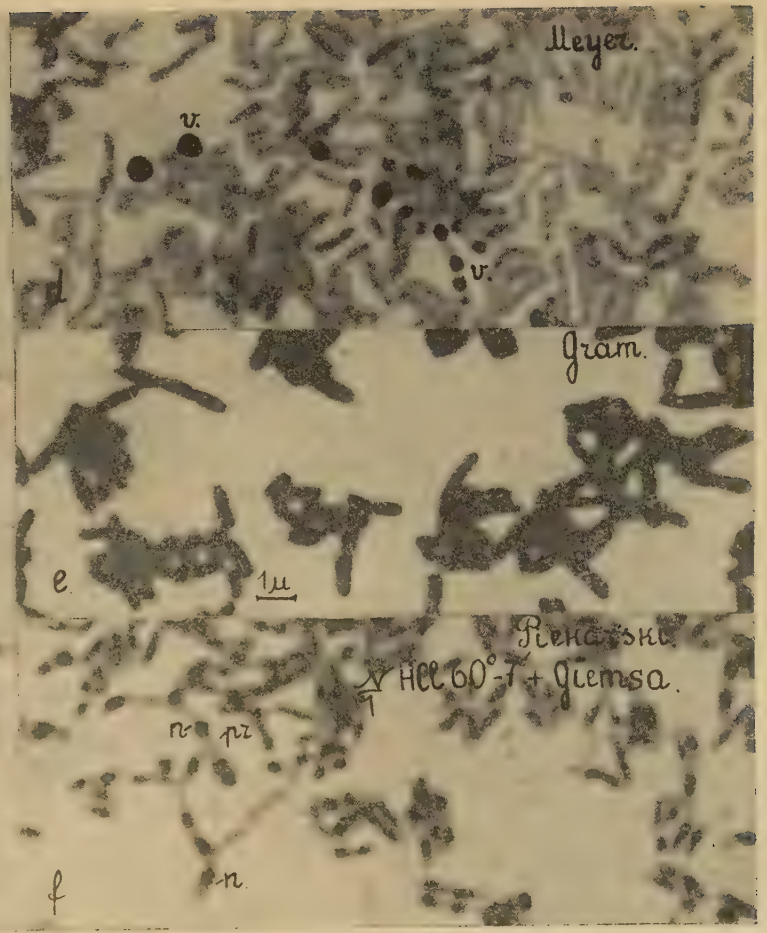

Meyer.
v.
v.
d
Gram.
e
1μ
Piekarski.
HCl 60°-7 + Giemsa.
n
pr
n.
f

Рис. 1

тим бактериям характерно для начала логарифмического роста всех Corynebacteriae) и затем их постепенном переходе в полиэнергидное состояние, совпадающее с падением количества токсина в среде. Волютин в данном опыте обнаруживался только в 4—6-дневной культуре в еще меньших количествах, чем при выращивании культуры на сыворотке Лёффлера; затем он исчезал и более не появлялся. На всех стадиях роста палочки содержали ядерные элементы, дифференцированные от протоплазмы. Практическое отсутствие волютина в особях штамма Park Williams № 8 оказалось очень удобным для кариологических исследований, трудности которых в случае волютинобразующих клинических культур возбудителя дифтерии описаны в другой работе (Пешков [4, 5]). Полученные результаты показывают настоятельную необходимость дальнейших исследований в этом новом направлении.

## Выводы

1. Целью настоящей работы являлось выяснить ход цитологических изменений известного производственного штамма Corynebacterium diphtheriae Park Williams № 8 при росте на бульоне, в процессе токсинообразования.

2. Установлено, что штамм Park Williams № 8 почти не образует гранул волютина, кратковременно появляющихся в ничтожном количестве особей лишь на 4-й день и затем быстро исчезающих (рис. 1, кадр a, *v*).

3. Применяя окраску по Фёльгену, методику Пешкова (Гимза — лихтгрюн), а также Пекарского — Робиноу (гидролиз *N* HCl при 60° в течение 7 минут + окраска по Гимза), удалось установить, что в противоположность включениям волютиновой природы особи штамма Corynebacterium diphtheriae Park Williams № 8 всегда, независимо от возраста культуры и среды, на которой они выращивались, содержат оформленные ядерные элементы хромосомного или нуклеоидного типа (рис. 1, кадр c).

4. При росте на бульоне, в процессе токсинообразования, посевной материал представлен крупными 1—2 нуклеоидными палочками (рис. 3, кадр a, особь 1). К началу токсинообразования, на 6-й день, особи энергично размножаются и резко мельчают, сохраняя ту же цитологию (дифференцированное ядро и протоплазму — рис. 3, кадр b, особь 2). На 16-й день, когда титр токсина начинает уменьшаться, все особи переходят в полиэнергидное состояние: они представлены длинными многоядерными нитями, слегка напоминающими подвижные червеобразные клетки Proteus (рис. 3, кадр c, особь 3).

Таким образом, было показано, что токсинообразование связано с карликовой бациллярной фазой роста Corynebacterium diphtheriae Park Williams № 8.

*Получено 6. VI. 1947*

Лаборатория цитологии бактерий
и Дифтерийный отдел Центрального
института эпидемиологии и микробиологии
Москва

## ЛИТЕРАТУРА

1. Белозерский А. Н. О химической природе волютина. Микробиология, т. XIV, вып. 1, 1945.
2. Пешков М. А. Цитология и кариология бактерий кишечно-тифозной группы. Журн. микроб., эпидем. и иммуноб., № 5—6, 1945.
3. Пешков М. А Кариология цикла развития бактерий Proteus vulgaris Hauser. Микробиология, т. XV, вып. 2, 1946а.
4. Пешков М. А. К цитологии Corynebacterium diphtheriae. Микробиология, т. XVI, вып. 2, 1947.
5. Пешков М. А. Полиэнергидные стадии развития бактерий в связи с изменениями их ядерного аппарата, Монография. Тр. Ин-та цитологии, гистологии и эмбриологии АН СССР, т. I, вып. 2, 1948.
6. Robinow C. F. Nuclear apparatus and cell structure of rod-shaped bacteria. Addendum to «The bacterial cell in its relation to problems of virulence, immunity and chemotherapy» by R. Dubos. 1945.

# БАКТЕРИИ КАК ПИЩА ДЛЯ ПРЕСНОВОДНЫХ МОЛЛЮСКОВ

*А. Г. Родина*

По мере накопления фактического материала все более выясняется роль бактерий как источник питания различных групп организмов, населяющих пресные водоемы и моря.

Предположения о возможности использования бактерий в питании теми или иными водными животными высказывались неоднократно различными авторами, но отсутствие точных данных о составе пищи различных групп водных животных, с одной стороны, и имевшиеся ранее неправильные представления о малой численности бактерий в водоемах,— представления, базировавшиеся на данных ранее применявшегося для счета бактерий в водоемах метода разливок, с другой стороны, не давали возможности представить реальное пищевое значение бактерий. В итоге применения методов непосредственного счета бактерий теперь известно, что содержание их в озерах, особенно в озерах эвтрофных и мезотрофных, выражается сотнями тысяч и миллионами на 1 см$^3$ (Кузнецов и Карзинкин [5]; Разумов [9]; Салимовская-Родина [10]; Хартулари и Кузнецов [14]; Веге́ [16]). В донных отложениях количество бактерий еще больше: оно достигает на 1 г сотен миллионов и миллиардов. Подобные количества бактерий находятся в детрите; так, например, содержание бактерий в детрите Коломенского озера доходило до 5 200 млн. на 1 г. Эти числа показывают реальность пищевого значения бактерий.

Наша предшествующая работа имела целью выявить значение бактерий в питании зоопланктона. Проведенные экспериментальные исследования показали, что бактерии являются полноценной пищей для планктеров-фильтраторов (Салимовская-Родина [12]; Родина [1]).

В настоящей работе ставилось целью выяснить пищевое значение бактерий для бентических организмов — пресноводных моллюсков.

Для выяснения этого вопроса экспериментальная работа была проведена с представителями Bivalvia и Gastropoda. Из Bivalvia были взяты Sphaerium corneum, Sphaerium rivicola, Musculium lacustre, Pisidium amnicum. Из Gastropoda были взяты Pulmonata — Lymnaea ovata, Lymnaea palustris, Planorbis planorbis и Prosobranchia — Bithynia tentaculata [2]. Этот список показывает, что было проведено экспериментальное питание животных, обитающих в различных по своему характеру местах.

Sphaerium corneum, Lymnaea ovata и Bithynia tentaculata были собраны в южной луке Коломенского озера — сильно заиленном водоеме, где эти моллюски в больших количествах были обнаружены Жадиным [3, 4] в зарослях телореза (Stratiotes aloides), на стеблях и листьях этих растений. Musculium lacustre были собраны в маленьком прудике, в илу среди гниющих листьев, Lymnaea palustris и Planorbis planorbis — в другом пруду, Sphaerium rivicola и Pisidium amnicum — в реке, имеющей песчаное русло, довольно сильное течение и незагряз-

[1] «Экспериментальное исследование питания Cladocera». Доклад на Всесоюзном гидробиологическом совещании, 1946.

[2] Определения моллюсков проведены В. И. Жадиным, за что приношу ему мою искреннюю благодарность.

ненную воду. Моллюски были собраны здесь в песчаном, слабо заиленном грунте.

Экспериментальная работа по питанию моллюсков велась в основном следующим образом. Собранные в водоеме животные после промывания и взвешивания размещались по одному в эрленмейеровские колбочки или узкие стаканы, закрытые ватными пробками, в профильтрованную через мембранный фильтр воду того же водоема. Фильтрованием удалялись все взвешенные вещества и все находившиеся в воде микроорганизмы. Помещая моллюсков в такую воду, мы вместе с ними вносили бактерий, которые могли здесь размножаться. Но никаких других питательных веществ, кроме растворенных и кроме бактерий, в такой воде быть не могло.

Часть опытов была проведена с бактериологически стерильными моллюсками, об этом будет изложено далее.

Подопытным животным давались для питания значительные количества взвесей бактерий или дрожжевых грибов. Смена воды и дача свежей пищи производились ежедневно (за очень редкими исключениями). В качестве пищи давались взвеси Azotobacter chroococcum, Bacillus subtilis и двух видов дрожжевых грибов (один Rhodotorula sp., второй — Torulopsis sp.), выделенных из донных отложений Коломенского озера. Для питания брались всегда двухсуточные культуры азотобактера и дрожжевых грибов и односуточные — Bac. subtilis.

Опыты с питанием моллюсков бактериями были сперва поставлены с Musculium lacustre, массовое развитие которых в одном из прудков на территории биологической станции «Залучье» наблюдалось летом 1947 г. Моллюски весом от 11 до 87 мг были рассажены в большинстве случаев по одному и в единичных опытах по два экземпляра в колбочки, содержащие только что профильтрованную воду этого пруда. Одни из них получали суспензию Az. chroococcum, другие — Torulopsis sp., третьи — контрольные — не получали ничего, кроме свежепрофильтрованной воды — во всех опытах при ежедневных сменах.

От отдельно отсаженных крупных экземпляров Musculium lacustre была получена молодь, которая после взвешивания (в этом случае общего для каждых 10 экземпляров) была рассажена в колбочки. Молодые экземпляры Musculium lacustre получали различное питание: одни — Azotobacter chroococcum, другие — Torulopsis sp., третьи — Bac. subtilis, четвертые — контрольные — только воду.

Поглощение моллюсками взвесей микробов можно было наблюдать непосредственно в колбах. Уже непосредственные наблюдения показывали, что Musculium lacustre неодинаково поглощают суспензии разных видов бактерий. Наиболее интенсивно поглощались хлопья Az. chroococcum, наименее Bac. subtilis. Поглощение моллюсками микроорганизмов было выяснено и из данных прямого счета, многократно проведенного. Для определения количества бактерий бралась вода из опытных колб непосредственно после дачи свежего корма и через сутки — перед сменой воды, т. е. дачей свежего корма. Так, при даче Az. chroococcum в количестве от 670 до 900 тыс. на 1 см$^3$ воды через сутки оставалось всего от 8 до 23 тыс. При даче Torulopsis sp. в количестве от 700 до 800 тыс. на 1 см$^3$ через сутки оставались лишь десятки тысяч.

Следует отметить, что при прямом счете оставшихся непоглощенными клеток как азотобактера, так и дрожжевых грибов просмотр препаратов наряду с ними всегда обнаруживал некоторое количество посторонней микрофлоры, большей частью очень мелких неспороносных палочек. Количество этих палочек было невелико и не могло итти ни в какое сравнение с количествами, даваемыми в качестве корма; биомасса же их вследствие их малых размеров и тем более была ничтожна по сравнению с биомассой таких относительно крупных клеток, как дрожжевые грибы и азотобактер,— и так как на результатах опытов

нельзя было отметить никакого воздействия этой ничтожной количественно бактериальной флоры, то она не учитывается в дальнейшем.

Бактерии, поглощаемые моллюсками, переваривались ими,— большое количество экскрементов, выделявшихся моллюсками, показывало это.

Musculium lacustre, находясь на бактериальном питании, перемещались по дну колб и не обнаруживали никаких отклонений в поведении от экземпляров, находившихся в условиях аквариумов. В большинстве опытов со взрослыми экземплярами у них было отмечено появление молоди. Очевидно, в этих случаях оплодотворение имело место еще в естественных условиях, эмбрионы развивались уже в указанных условиях эксперимента. Молодь появлялась в количестве от 1 до 6 у отдельных экземпляров через различные сроки от начала опыта. У моллюсков, помещенных попарно, появление молоди было констатировано неоднократно (до трех раз за 40 суток). Такое появление молоди указывало на оплодотворение уже в условиях эксперимента. Появлявшаяся молодь, содержавшаяся в тех же условиях (бактериальное питание), увеличивалась в весе и не показывала никаких отклонений от нормы. Это обстоятельство указывало также на полноценность получаемого моллюсками питания.

Определения веса подопытных экземпляров были проведены через 30 и 40 суток после начала опытов. Musculium lacustre за 40 суток нахождения на бактериальном питании дали следующее увеличение веса:

на взвеси Azotobacter chroococcum от 13 до 48%
» » Torulopsis sp. » 29 » 57 »

Для правильного суждения об увеличении веса моллюсков надо принять еще во внимание появление у них молоди.

Большинство контрольных экземпляров, получавших только воду, профильтрованную через мембранный фильтр, погибло ранее 40 суток, три оставшиеся живыми потеряли в весе от 17 до 23%.

Молодь Musculium lacustre, помещенная на бактериальное питание сразу по своем появлении на свет, показала за 40 суток еще большее увеличение веса. У моллюсков, имевших в качестве основного питания взвеси Azotobacter chroococcum, вес тела возрос за этот срок в 2—2,5 раза. Аналогичные результаты были получены у моллюсков, получавших Torulopsis sp., Bac. subtilis, слабо поедаемый бактериями, оказался и наименее питательным. Увеличение веса у молоди Musculium lacustre на этом питании было всего в 1,1—1,3 раза. Контрольные экземпляры погибли все в течение второй и третьей недели.

Sphaerium corneum также охотно поедали даваемых им в качестве корма бактерий и во всех без исключения опытах прибавили в весе:

на Azotobacter chroococcum от 4,1 до 15 %
» Torulopsis sp. » 8,0 » 22 »
» Rhodotorula sp. » 5,2 » 17,6 »
» Bac. subtilis » 3,1 » 11,8 »

Из контрольных экземпляров Sphaerium corneum, получавших только воду, профильтрованную через мембранный фильтр, часть погибла; часть, оставшаяся в живых, потеряла от 7,4 до 18,8% первоначального веса.

Sphaerium rivicola и Pisidium amnicum, собранные в реке, содержались на профильтрованной через мембранный фильтр озерной воде. Все они получали только взвеси Azotobacter chroococcum и все прибавили в весе (за 40 суток от 1,5 до 4,9%).

Опыты с кормлением бактериями и дрожжевыми грибами Gastropoda могут быть разделены на: 1) кормление взрослых моллюсков различ-

ного веса, 2) выращивание на бактериальных суспензиях моллюсков, только что вылупившихся из кладок. Ко вторым относятся опыты с выращиванием Lymnaea ovata, полученных из кладок в бактериологически стерильном состоянии.

Взрослые экземпляры Bithynia tentaculata были взяты весом от 9 до 29,5 мг. Не все они выжили до конца опыта. Причина гибели осталась неустановленной. Большая часть, однако, благополучно выжила до конца опыта (35 суток) и прибавила в весе:

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| на Azotobacter chroococcum | от | 6,3 | до | 30% |
| » Torulopsis sp. | » | 17,5 | » | 33,3 » |
| » Rhodotorula sp. | » | 5,0 | » | 21,4 » |
| » Bac. subtilis | » | 3,1 | » | 17,0 » |

Контрольные экземпляры частью погибли, остальные потеряли 9—18,8% их первоначального веса.

Взрослые экземпляры Lymnaea ovata были взяты весом от 9,0 до 26 мг. За 35 суток они дали увеличение веса:

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| на Azotobacter chroococcum | от | 9,7 | до | 33,3% |
| » Torulopsis sp. | » | 10,3 | » | 55,4 » |
| » Bac. subtilis | » | 1,9 | » | 9,9 » |

Для опытов выращивания молодых моллюсков на бактериальном питании были собраны кладки Lymnaea palustris и Planorbis planorbis. Вылупившиеся моллюски были обычным образом питаемы бактериями (Azotobacter chroococcum). За 50 суток — время опыта — из крошечных, едва видимых моллюски выросли относительно их первоначального размера в несколько раз. Увеличение веса у Lymnaea palustris было в 3—6 раз, у Planorbis planorbis — в 4—5 раз. Из контрольных экземпляров ни один не дожил до 50 суток. Все они погибли в течение третьей недели (от начала опыта).

Эти опыты особенно ясно показали ценность бактериального питания. Получая взвеси Azotobacter chroococcum, моллюски росли, не обнаруживая никаких заметных отклонений от нормы.

Наряду с этими опытами были проведены эксперименты с выращиванием Lymnaea ovata, полученных в бактериологически стерильном состоянии. Для этого были собраны кладки этого моллюска. Эти кладки, по определению Некрасова [8], принадлежат к типу кладок с истинным коконом, т. е. являются такими, «где яйца включены в слизь, окруженную в свою очередь особой стенкой». Сами яйца хорошо защищены — имеют две оболочки: внутреннюю и широкую наружную, состоящую из ряда тонких слоев. Исходя из предположения, что яйца и слизь, в которую они заключены, должны являться стерильными и защищенными толстой наружной оболочкой от проникновения бактерий, мы предприняли попытку получения бактериологически стерильных животных из таких кладок. Задача эта, по нашему предположению, сводилась: 1) к отделению кладки от листа, к которому она была прикреплена, без повреждения наружной стенки и 2) к стерилизации наружной поверхности кладки. Эта стерилизация осуществлялась погружением кладки в растворы риванола на стерильной воде. Для опытов отбирались такие кладки, в которых моллюски были близки к вылуплению. Получить стерильные кладки удалось всего в трех случаях из многочисленных попыток. Крепость растворов риванола и время содержания кладок в этих растворах были различны. Растворы брались крепостью от 0,001 до 0,006%. Кладки выдерживались в них от 18 до 36 часов. За время стерилизации кладки переносились с соблюдением условий стерильности 2—3 раза в такие же растворы. После растворов риванола кладки промывались проведением через ряд колб со

стерильной водой (с соблюдением условий стерильности) и в последней оставлялись для развития. Риванол проникал в слизь кладок, вследствие чего она окрашивалась в желтоватый цвет, но в большинстве случаев это не оказывало вредного действия на развитие моллюсков, и они вылуплялись благополучно, несмотря на длительное пребывание в растворе риванола. Проверка стерильности моллюсков производилась высевами воды из той колбы, где моллюски оставались после стерилизации до их вылупления, в МПБ. Стерильные моллюски были получены при содержании кладки в одном случае в растворе риванола крепостью 0,006% в течение 18 часов и в двух других случаях в течение 24 часов. Можно предполагать, что незаметное повреждение наружной стенки кладки дает возможность бактериям проникнуть в слизь и в таком случае получение стерильной кладки делается невозможным даже при 36-часовой выдержке ее в риваноле. Все попытки получить бактериологически-стерильными кладки применением растворов пенициллина в стерильной воде не дали положительных результатов: кладки погибали, а стерильность не достигалась, так как пенициллин не оказывал убивающего действия на значительную часть микрофлоры.

Получение бактериологически стерильной кладки давало сразу значительное количество бактериологически стерильных моллюсков — достаточное для серии опытов.

Эксперименты с моллюсками, полученными в бактериологически стерильном состоянии, имели целью подтвердить неодинаковую пищевую ценность различных видов бактерий, обнаруженную предшествующими нестерильными опытами; кроме того, существенно было получить моллюсков в таком состоянии.

Бактериологически стерильные Lymnaea ovata развивались несколько медленнее, чем нестерильные Lymnaea palustris и Planorbis planorbis. Стояло ли это в связи со строгой ограниченностью их питания одним видом бактерий или здесь проявлялось неблагоприятное действие стерилизации, сказать сейчас невозможно. Тем не менее рост моллюсков был заметен даже при простом наблюдении. Взвешивание показало увеличение веса: за 30 суток на взвеси Azotobacter chroococcum в 1,5—2 раза, на взвеси Torulopsis sp. в 1,8—2,3 раза, на взвеси Bac. subtilis в 1,2—1,3 раза.

Таким образом, из рассмотрения итогов всех опытов ясно видно, что бактерии используются моллюсками в пищу. Пищевая ценность бактерий неодинакова. Итоги экспериментов показывают, что Torulopsis sp., Rhodotorula sp. и Azotobacter chroococcum имеют более высокое пищевое значение, чем Bac. subtilis.

Неодинаковая пищевая ценность бактерий была обнаружена нами при выяснении роли бактерий в питании Cladocera (Салимовская-Родина [12], Родина [3]) на большом количестве видов бактерий и в опытах с питанием моллюсков получила новое подтверждение.

Это различие в пищевой ценности отдельных видов бактерий обусловливается, повидимому, рядом причин. При питании любого животного необходимо обеспечить его потребность как в пластических элементах питания, включая и минеральные соли, так и витаминах. Химический состав различных видов бактерий неодинаков (Виноградов [2]) — количество зольных элементов у разных видов микробов колеблется в широких пределах. Различно и содержание белковых веществ — основного источника поддержания аминокислотного баланса организма. Содержание жира и углеводов в клетках отдельных видов бактерий колеблется в широких пределах. Еще более велико различие в содержании витаминов. Работы Осборна и Менделя, Митчелля и др. показали, что биологическая ценность белков определяется их амино-

[3] См. выше сноску 1.

кислотным составом. Сравнение аминокислотного состава белков бактерий с растительными белками и белками животными, проведенные Stokes и Gunness [21], привело их к заключению, что нет фундаментального различия в аминокислотном составе между ними. Однако внутри мира микробов существуют, по их данным, широкие колебания.

Дрожжевые клетки богаты питательными элементами. В сухом веществе дрожжей 90—95% приходится на долю органических веществ. Из неорганических веществ дрожжевых клеток 50% приходится на фосфорную кислоту; значительно содержание калия. Из органических веществ почти 90% составляют истинные белки. Белки дрожжевых клеток содержат все необходимые аминокислоты (Block и Bolling [17]). Дрожжевые клетки накапливают в себе значительные количества углеводов (главным образом гликогена) и жира. Наконец, дрожжи синтезируют в своих клетках значительные количества витаминов комплекса В и другие витаминоподобные вещества. Мейсель [6] указывает, что дрожжевые клетки содержат в себе следующие витамины и витаминоподобные вещества: тиамин, рибофлавин, никотиновую кислоту, биотин, пантотеновую кислоту, инозит, *p*-аминобензойную кислоту и эргостерин, а розовые дрожжи еще и β-каротин. Труфанов [13] показал, что все известные в настоящее время элементы сложного комплекса витамина В одновременно присутствуют в дрожжах. Таким образом, понятно, что дрожжевые клетки, даваемые в больших количествах, обеспечивали питание моллюсков.

Высокой пищевой ценностью обладает и азотобактер. Данных о химическом составе клеток азотобактера значительно меньше, чем о составе дрожжевых клеток. Тем не менее имеющиеся данные говорят о высоком пищевом значении его белков, о полноценности его аминокислотного состава (Camien, Salle и Dunn [18]), о значительном накоплении его клетками жировых веществ (Rundon [21]) и о богатстве его витаминами и витаминоподобными веществами. По данным Lee и Burris [19], клетки азотобактера синтезируют одни витамины в количествах, равных дрожжевым клеткам, другие в бо́льших, чем дрожжевые клетки. Они обнаружили в клетках азотобактера рибофлавин, тиамин, биотин, никотиновую и пантотеновую кислоты. Однако нет сомнения, что этим не исчерпываются все витаминоподобные вещества, синтезируемые азотобактером. Содержание витаминов в азотобактере настолько велико, что Lee и Burris предлагают использовать азотобактер в качестве сырья для получения витаминов.

Bac. subtilis в отношении аминокислотного состава своих белковых веществ не обнаруживает никаких отклонений качественного характера (Stokes и Gunness [21]), но количественные соотношения различных аминокислот здесь иные, чем у дрожжевых клеток или у видов азотобактера. Клетки Bac. subtilis относительно бедны жировыми веществами. Rundon [20] по содержанию жировых веществ разделяет бактерий на 3 группы: к I — с наибольшим содержанием их — он относит виды азотобактера, ко II — с небольшим содержанием жира — Bac. subtilis; III группа бактерий почти не накапливает жира в своих клетках. Наибольшие же отличия обнаруживает Bac. subtilis в содержании витаминов. Бойсен-Иенсен [1] указывает Bac. subtilis в числе видов бактерий, способных к синтезу ростовых веществ. По данным же Нахимовской [7], Bac. subtilis не синтезирует ростовых веществ типа биос.

Таким образом, состав витаминоподобных веществ, синтезируемых Bac. subtilis, видимо, весьма ограничен и количественное содержание их ничтожно по сравнению с такими могучими накопителями витаминов, какими являются дрожжевые грибы и виды азотобактера. Широко известно теперь значение витаминов и других ростовых веществ для нормального развития животного организма. Выяснено, что для этого не-

обходим не один или два витамина, а весь комплекс В. Таким образом, это говорит о низкой пищевой ценности Bac. subtilis.

Различие в пищевой ценности бактерий было, как уже указывалось выше, обнаружено нами при экспериментальном питании Cladocera (D. magna). Для этих рачков, как и для моллюсков, дрожжевые грибы и виды азотобактера являлись высокопитательными, а Bac. subtilis оказался кормом, недостаточным для обеспечения нормального развития.

Химический состав бактерий изучен еще мало. Очевидно, что только подробные анализы как общего содержания белков, жиров и углеводов, так и аминокислотного состава белковых веществ и содержания витаминов у отдельных видов бактерий при одновременном биологическом выяснении пищевой ценности дадут ясное понимание причины различного значения разных видов бактерий как пищи.

О реальном значении бактерий в питании моллюсков говорят приведенные выше высокие числа содержания их в детрите и грунтах. Чтобы представить реальное значение в питании моллюсков дрожжевых грибов, надо иметь данные об их нахождении в донных отложениях водоемов — местах обитания моллюсков. Предпринятые летом 1947 г. исследования по количественному содержанию дрожжевых грибов в 8 озерах, одном водохранилище и реке (в районе Залучинской биологической станции Зоологического ин-та АН) показали широкое распространение этих микроорганизмов в грунтах различного характера. Выяснилось, что дрожжевые грибы образуют в грунтах скопления различной величины. Дрожжевые грибы в значительных количествах неизменно обнаруживались на стеблях и листьях водных растений, в налетах на камнях и в детрите.

Азотобактер также находится в грунтах и в еще больших количествах на стеблях и листьях водных растений, как это было ранее установлено нами (Салимовская-Родина [11]).

Таким образом, несомненно, что в естественных условиях моллюски используют эти виды микробов в своем питании.

В заключении статьи отметим, что ZoBell и London [22], ZoBell и Feltham [23] была проведена работа по изучению роли бактерий в питании морского моллюска (Mytilus californianus). В опытах производилось кормление этих моллюсков культурами бактерий, выделенных из морской воды: Rhodococcus agilis и Bac. marinus n. s. Моллюски, взятые для опытов, не были бактериологически стерильными, смена воды проводилась один раз в месяц. Для опытов были взяты представители этого вида весом от 2 до 50 г. Результаты опытов привели авторов к выводу о высоком пищевом значении бактерий для Mytilus californianus. Авторы не отметили различия в пищевой ценности отдельных видов бактерий — ими были получены близкие числа увеличения веса моллюсков при питании обеими формами: красным кокком и клетками бацилла. Проводимая в этой работе смена воды всего 1 раз в месяц, очевидно, давала возможность развития в воде и иной бактериальной флоре (внесенной с моллюсками), которая могла нивелировать пищевое различие даваемых суспензий. Возможно, что пищевая ценность использованных видов была близка, но судить об этом нельзя ввиду отсутствия данных по этому вопросу.

## Выводы

1. Экспериментальная работа по кормлению бактериями и дрожжевыми грибами различных пресноводных моллюсков, как Gastropoda (Lymnaea ovata, Lymnaea palustris, Planorbis planorbis, Bithynia tentaculata), так и Bivalvia (Sphaerium corneum, Sphaerium rivicola, Musculium lacustre, Pisidium amnicum), показала, что моллюски используют их в своем питании.

2. Пищевая ценность бактерий неодинакова.

3. Нет сомнения в том, что в природных условиях бактерии и дрожжевые грибы являются пищей для моллюсков.

Гидробиологический отдел Зоологического института
Академии Наук СССР
Ленинград

*Получено 10.XII.1947*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бойсен-Иенсен П. Ростовые вещества растений. 1936.
2. Виноградов А. П. Химический элементарный состав организмов моря. Труды биогеохим. лаб., VI, 1944.
3. Жадин В. И. Пресноводные моллюски СССР. 1933, Ленинград.
4. Жадин В. И. Моллюски. Фауна СССР, т. IV, 1938. М.—Л. Изд. АН СССР.
5. Кузнецов С. И. и Карзинкин Г. С. Метод количественного учета бактерий в воде. Гидробиолог. журн., т. IX, вып. 1—3, 1930.
6. Мейсель М. Н. Обогащение дрожжей витаминами. Пищевая промышленность, № 9, 1944.
7. Нахимовская М. И. Синтез ростовых веществ типа «биос» почвенными бактериями. Микробиология, т. X, вып. 6, 1941.
8. Некрасов А. Д. Наблюдения над кладками пресноводных моллюсков. IV. Кладки рода Lymnaea. Русск. Зоолог. журн., т. 8, вып. 1, 1928.
9. Разумов А. С. Прямой метод учета бактерий в воде. Микробиология, т. I, вып. 2, 1932.
10. Салимовская-Родина А. Г. О вертикальном распределении бактерий в воде озер. Микробиология, т. VII, вып. 6, 1938.
11. Салимовская-Родина А. Г. Местонахождение азотобактера в пресных водоемах. ДАН СССР, т. XXV, № 5, 1939.
12. Салимовская-Родина А. Г. Бактерии и дрожжевые грибки как пища для Cladocera. ДАН СССР, т. XXIX, № 3, 1940.
13. Труфанов А. В. Получение чистых витаминов $B_1$ и $B_2$ из дрожжей наряду с эргостерином. Биохимия, т. I, вып. 4, 1938.
14. Хартулари Е. М. и Кузнецов С. И. Результаты просчетов общего числа бактерий в воде озер Вышневолоцкого района. Тр. Лимнол. станц. в Косино, вып. 21, 1937.
15. Baker F. C. The molluscan family Planorbidae. 1945, Urbana.
16. Beré R. Numbers of bacteria in inland laces of Wisconsin. Intern. Rev. Hydrobiol., v. 29, 1933.
17. Block R. J. and Bolling D. The amino acids yielded by various yeasts. Arch. Biochem., v. 7, No. 2, 1945.
18. Camien M. N., Salle A. and Dunn M. Investigation of amino acids, peptids and proteins. Arch. Biochem., v. 8, No. 1, 1945.
19. Lee S. and Burris R. Large scale production of Azotobacter. Ind. and Eng. Chem., v. 35, No. 3, 1943.
20. Rundon K. Fatty material in bacteria and fungi revealed by staining, dried, fixed slide preparations. J. Bact., v. 52, No. 6, 1946.
21. Stokes J. and Gunness M. The amino acid composition of microorganisms. J. Bact., v. 52, No. 2, 1946.
22. ZoBell C. and London W. Bacterial nutrition of the california mussel. Proc. Soc. Exper. Biol. Med., v. 36, 1937.
23. ZoBell C. and Feltham W. Bacteria as food for certain marine invertebrates. Cont. Scripps Inst. of Ocean. New Ser., No. 40, 1937.

# О ПРИРОДЕ БАКТЕРИОФАГА

## III. РОЛЬ ЗАЩИТНЫХ КОЛЛОИДОВ В СОХРАНЕНИИ УСТОЙЧИВОСТИ БАКТЕРИОФАГА ПРИ ДЕНАТУРИРУЮЩИХ ВОЗДЕЙСТВИЯХ

*А. Е. Крисс* и *Е. А. Рукина*

Литература о феномене бактериофагии насчитывает несколько тысяч названий. Среди этого огромного числа работ можно наметить две основные группы исследований: одну — посвященную собственно бактериофагу, его характерным особенностям, другую — связанную с разработкой проблемы фаготерапии и фагопрофилактики инфекционных заболеваний. В первой группе наиболее выдающееся место по числу занимают исследования, ставившие своей целью определить влияние на бактериофаг разнообразнейших физических и химических воздействий. Опубликованный фактический материал, часть которого приведена в обзорной статье (Крисс [5]), дает много ценного для суждения о ряде свойств бактериофага.

Если попытаться обобщить нередко противоречивые литературные данные, то прежде всего отчетливо вырисовывается неодинаковая реакция различных бактериофагов на действие одних и тех же факторов в однотипных условиях эксперимента и второе — определяющее значение субстрата, в котором находились корпускулы фага, на результаты опытов. Легко заметить прямую зависимость инактивирующего действия многих факторов не только от качественных особенностей данного бактериофага, но и от окружающей его среды. Для иллюстрации степени влияния состава среды можно указать, например, что фаголизаты дизентерийной палочки, а в особенности фаголизаты стафилококка, стрептококка и возбудителей газовой гангрены, приготовленные на мясопептонном бульоне или равноценных белковых средах, значительно более устойчивы при хранении, чем фаголизаты этих же бактериальных форм, полученные на физиологическом растворе. Срок жизни бедных белком препаратов бактериофага непродолжителен: процесс инактивации их происходит быстрее по сравнению с аналогичными препаратами на полноценных мясных субстратах.

Эти явления представляют большой интерес, они приводят к предположению о защитной роли белков в сохранении активности бактериофага. Создается определенное впечатление о значении функционального состояния белкового компонента фагового корпускула для стабильности всей системы; степенью уязвимости его к денатурирующим явлениям, повидимому, определяется в конечном счете и устойчивость литической группы.

Следующие эксперименты обосновали возможность такого пути инактивации бактериофага. Были выбраны 2 фактора — температурный и высушивание, которые оказывают денатурирующее действие на белки.

### Устойчивость неочищенного и очищенного бактериофагов к температурным воздействиям

В первую очередь важно было установить, насколько неочищенный фаг сам по себе, вне других составных элементов фаголизата, в своем отношении к температурному фактору отличается от очищенного фага.

В связи с этим возникала задача отделения корпускула фага от бульона и других примесей, находящихся в фаголизате, не связанных с ним, т. е. получения препаратов неочищенного бактериофага, свободного от окружающей его среды. В определенной мере эту задачу удалось разрешить путем адсорбции бактериофага на мелу.

Как указывалось ранее (Крисс и Рукина [4, 6]), фильтрация фаголизатов через меловые колонки позволяет в известных условиях освободить целиком жидкий субстрат от фаговых частиц, остающихся на мелу в адсорбированном состоянии. Фильтраты фаголизатов, прошедших сквозь слой мела, органолептически не отличаются от обычных бульонов по цвету, запаху и вкусу. Это не означает, конечно, что известная часть поверхностно-активных веществ, равных в своем адсорбционном сродстве к мелу бактериофагу, не адсорбируется вместе с ним, однако практически отделение таких веществ, как и бактериофага, не сказывается на внешнем виде фаголизата после фильтрации.

Методика опытов заключалась в следующем.

Из общего объема в 500 мл фаголизата дизентерийной палочки Шига 200 мл пропускалось через колонку мела весом 10 г, а остальное количество очищалось методом фракционированной элюции.

После окончания процесса фильтрации фаголизата сквозь мел, колонки промывались 250 мл дистиллированной воды. Затем мел с адсорбированным фагом извлекался из воронок Бюхнера и суспензировался в 200 мл дистиллированной воды. По 5 мл этой суспензии, так же как и 5 мл исходного бульонного фаголизата, прогревались полчаса на водяной бане при 42, 50, 56, 60 и 65°.

«Асканитный», «норитный» и «меловой» элюаты подвергались действию только температуры в 42°.

Определение титров производилось методом Аппельмана с регистрацией результатов опытов через 18—20 часов. Титры фага в меловых адсорбционных комплексах определялись после растворения мела в 5 *N* $CH_3COOH$.

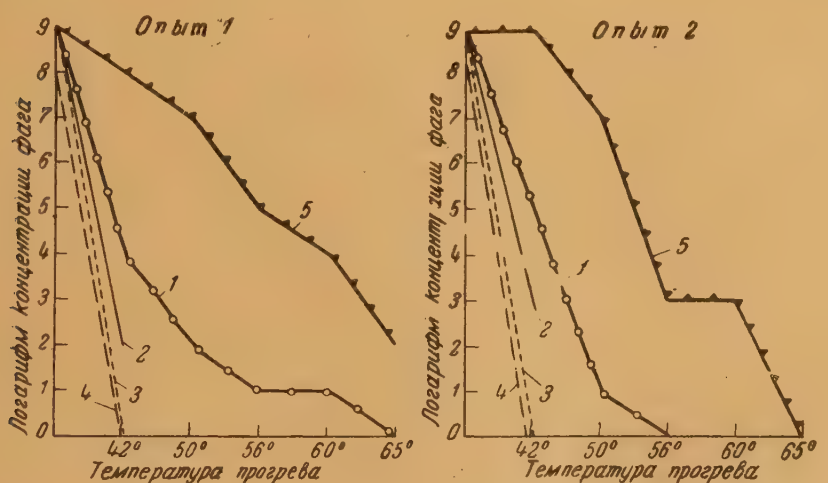



Рис. 1. Влияние различных температур на бульонные фаголизаты, фаги, выделенные из фаголизатов, и очищенные бактериофаги:

*1* — меловой адсорбционный комплекс; *2* — асканитный элюат; *3* — норитный элюат; *4* — меловой элюат; *5* — бульонный фаголизат

Опыты привели к следующим результатам (рис. 1). Оказалось, что освобождение бактериофага от прочих компонентов бульонного фаголизата в значительной мере понижает устойчивость его к нагреванию. Она несравненно ниже устойчивости бактериофага в фаголизате. Заметное снижение концентрации фаговых частиц наблюдалось в суспензиях меловых адсорбционных комплексов уже при 42°. Только в некоторых опытах обнаруживались следы бактериофага, адсорбированного на мелу, после нагревания при 56—60°, тогда как в бульонных фаголиза-

тах после такого прогрева бактериофаг можно было определить еще в разведениях $10^{-3}$, $10^{-4}$ и даже $10^{-5}$.

Вместе с тем сопоставление титров фага в меловых адсорбционных комплексах и в асканитных элюатах после действия одних и тех же температур показывает, что удаление бульона и ряда примесей, растворенных в нем,— продуктов обмена и распада бактериальных клеток — не вызывает такой лабильности корпускул бактериофага, какая наступает в результате очистки на асканите. Титры фага в меловых адсорбционных комплексах, прогретых при 42°, составляли $10^4$—$10^5$, в асканитных элюатах $10^2$—$10^3$, и здесь нужно учесть влияние высокой концентрации солей в асканитном элюате, которая, возможно, имеет, как выяснилось в опытах с диализом, защитное значение.

Таким образом, из этих опытов следовало заключить, что бактериофаг, выделенный из фаголизата, занимает как бы промежуточное положение по устойчивости к температурному фактору между бульонным фаголизатом и очищенными фагами. Своеобразие его отношения к нагреву могло определяться механическим отделением от белковой среды и частичной очисткой в процессе адсорбции на мелу.

### Роль защитных коллоидов при температурных воздействиях на бактериофаг

Для более полного суждения о причинах, обусловивших термолабильность бактериофага, извлеченного из фаголизата, опыты были продолжены.

Как и в предыдущих экспериментах, бактериофаг отделялся от фаголизата дизентерийной палочки Шига фильтрацией через колонки мела. В одной серии опытов меловые адсорбционные комплексы после промывания их водой суспензировались в фильтрате фаголизата, прошедшего сквозь слой мела. В другой серии применялась другая методика.

На поверхности промытых водой колонок мела с адсорбированным фагом распределялось 60 г сернокислого аммония, и через них медленно пропускался фильтрат фаголизата. В процессе фильтрации сульфат аммония растворялся, создавая условия насыщенного раствора, благодаря чему на поверхности колонки и в слое адсорбента осаждались белки и другие вещества фаголизата. Меловые колонки приобретали желто-коричневый цвет — фильтраты фаголизата представляли собой бесцветную, прозрачную жидкость. Меловые адсорбционные комплексы затем суспензировались в этой жидкости.

Фильтраты фаголизатов прибавлялись также к асканитному, норитному и меловому элюатам. Все опытные фракции прогревались при различных температурах, и затем в них определялся титр бактериофага.

Эти опыты показали (рис. 2), что бульонные фаголизаты являются средой, обладающей защитными свойствами по отношению к заключенным в ней корпускулам бактериофага. Добавление фильтратов фаголизата к фаговым частицам, извлеченных мелом из фаголизатов, вызывало явный эффект повышения их резистентности к температурным воздействиям. В опыте № 1 титр фага из мелового адсорбционного комплекса, суспензированного в фильтрате фаголизата и прогретого при 42°, не отличался от титра бульонного фаголизата, подвергавшегося действию такого же нагрева, тогда как в этих условиях суспензия бактериофага в дистиллированной воде заметно снизила свой титр. После нагревания при 50° бактериофаг в фильтрате фаголизата имел титр $10^6$, а в дистиллированной воде $10^1$. Начиная с температурных воздействий в 56°, бактериофаг мог быть констатирован только в суспензии мелового адсорбционного комплекса в фильтрате фаголизата и в бульонном фаголизате.

В опыте № 5 сопоставлялось влияние различных температур на бульонный фаголизат и бактериофаги, соединенные механическим путем с веществами фаголизатов, от которых они были отделены. Необходимо признать, анализируя полученные данные, что хотя терморезистентность

фаговых корпускул значительно возрастает после возвращения их в «исходную обстановку», однако она уступает устойчивости бульонного фаголизата. Возможно, причиной этого является частичная очистка бактериофага в результате адсорбции на мелу от субстанции, имеющей более тесное отношение к корпускулу фага, чем другие вещества, переходящие в фильтрат. Заслуживает внимания также тот факт, что лучшие результаты получались при суспензировании меловых адсорбционных комплексов в фильтратах фаголизатов, если последние не подвергались обработке сернокислым аммонием, который, повидимому, в известной мере денатурирует защитные коллоиды бульона.

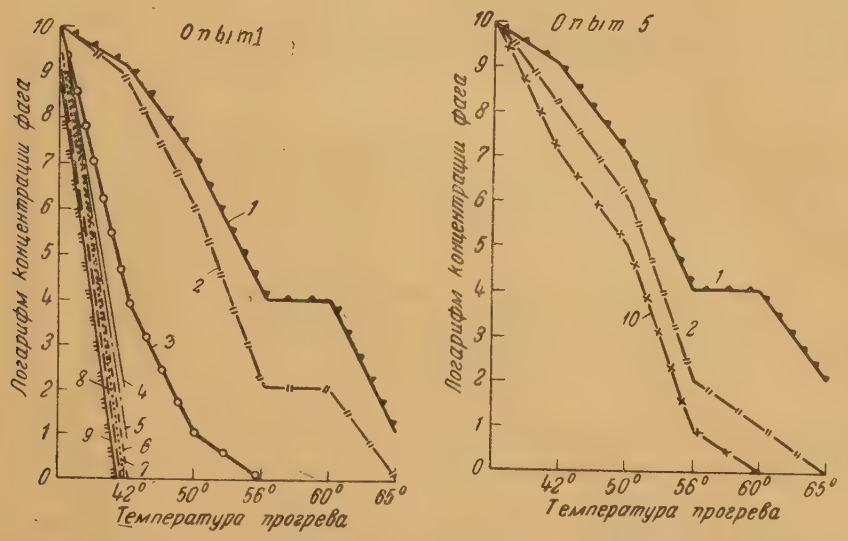



Рис. 2. Определение устойчивости к различным температурам неочищенных и очищенных бактериофагов при прибавлении веществ, содержащихся в свободных от фагов фаголизатах:

*1* — бульонный фаголизат; *2* — меловой адсорбционный комплекс в фильтрате фаголизата; *3* — меловой адсорбционный комплекс в дистиллированной воде; *4* — асканитный элюат; *5* — смесь асканитного элюата с фильтратом фаголизата; *6* — норитный элюат; *7* — смесь норитного элюата с фильтратом фаголизата; *8* — меловой элюат; *9* — смесь мелового элюата с фильтратом фаголизата; *10* — смесь мелового адсорбционного комплекса с веществами, осажденными из фаголизата сульфатом аммония

Самым существенным в проведенных опытах явилось то обстоятельство, что прибавление фильтратов фаголизата к очищенным бактериофагам — асканитному, норитному и меловому элюатам — не вызвало никаких изменений в их термоустойчивости. Если корпускулы бактериофага, адсорбированные мелом и затем помещенные в фильтраты фаголизата, обретали вновь резистентность к нагреванию, то очищенные фаги оставались столь же лабильными, так же быстро инактивировались, когда их окружала белковая среда. Остается заключить, что активная группа сама по себе или в соединении с дериватами белкового компонента не обладает устойчивостью к внешним воздействиям и легко подвергается деструкции вне белкового носителя. И далее, что защитное действие фаголизата проявляется в отношении литической группы не непосредственно, а через белковый компонент, играющий, повидимому, стабилизирующую роль. Изменения в его состоянии сказываются на устойчивости основных функций бактериофага. Предохраняя белковый компонент от денатурации, коллоиды, благодаря этому, обеспечивают стабильность всей системы — корпускула фага.

Дальнейшие исследования показали в еще большей степени, насколько велика может быть роль защитных коллоидов в сохранении активности бактериофага при различных внешних воздействиях.

В приводимых опытах также испытывалось влияние температурного фактора, но здесь наряду с фильтратами фаголизата применялись и такие коллоидные растворы, как МПА, мясопептонная желатина, яичный белок и нормальная лошадиная сыворотка.

Методика этих экспериментов мало отличалась от предыдущих. Часть бульонного фаголизата дизентерийной палочки Шига (200 мл) профильтровывалась через колонку мела весом 10 г, другая часть (250 мл) очищалась методом фракционированной элюции.

После промывки дистиллированной водой меловые адсорбционные комплексы извлекались из воронок, тщательно растирались в ступке и делились на 5 частей. Одна часть смешивалась в пробирке с 10 мл 0,5% МПА, 2-я часть — с 10 мл 10% мясопептонной желатины, 3-я часть — с 10 мл яичного белка, 4-я часть — с 10 мл нормальной лошадиной сыворотки, 5-я часть — с 10 мл фильтрата фаголизата. Все применявшиеся коллоидные растворы добавлялись также к асканитному, норитному и меловому элюатам в равных объемах. Нагревание опытных фракций производилось при температурах 42; 50; 56; 60 и 65° в течение 30 минут.

На рис. 3 приведены результаты проведенных опытов. Они дают характеристику защитных свойств ряда коллоидов при действии различных температур на бактериофаги.

По данным опыта № 2 можно судить о том, что в равных условиях прибавление желатины обусловливает резкое повышение термоустойчивости бактериофага в меловых адсорбционных комплексах. Устойчивость его к нагреванию превосходит не только терморезистентность фага в меловых адсорбционных комплексах, соединенных с фильтратом фаголизата, но и бульонных фаголизатов. Особенно ощутима эта разница при нагревании свыше 50°.

В опыте № 3 также отчетливо выступают преимущества нормальной лошадиной сыворотки. Прогрев мелового адсорбционного комплекса в смеси с ней при 65° позволяет сохранить сравнительно высокую концентрацию бактериофага, тогда как в бульонном фаголизате остаются лишь следы фага.

При сравнении степени защитного действия примененных коллоидных растворов создается впечатление, что лошадиная сыворотка и яичный белок дают лучший эффект, чем желатина и агар-агар. Как показали последующие опыты, многое зависит от концентрации коллоидов, в смеси с которыми производится нагревание меловых адсорбционных комплексов.

Очищенные бактериофаги — асканитный, норитный и меловой элюаты от добавления защитных коллоидов не приобретают устойчивости к температурным воздействиям. С известной осторожностью, учитывая пределы точности метода титрования по Аппельману, можно предполагать некоторое повышение терморезистентности асканитного элюата; норитный и меловой элюаты полностью инактивируются в присутствии агар-агара, желатины, яичного белка и сыворотки, если их нагревать при 42°.

Эти опыты еще более укрепляют представление о том, что защита белкового компонента от денатурации имеет существенное значение для сохранения литической активности бактериофага. Изолированный литический компонент не в состоянии противостоять нагреву при невысокой температуре, даже находясь в коллоидной среде. Связь его с белковым компонентом создает устойчивость функциональным особенностям бактериофага, причем эта устойчивость может быть значительно повышена, если с помощью защитных коллоидов предотвратить фаг от одного из возможных путей инактивации — изменения в состоянии белкового компонента, его денатурации.

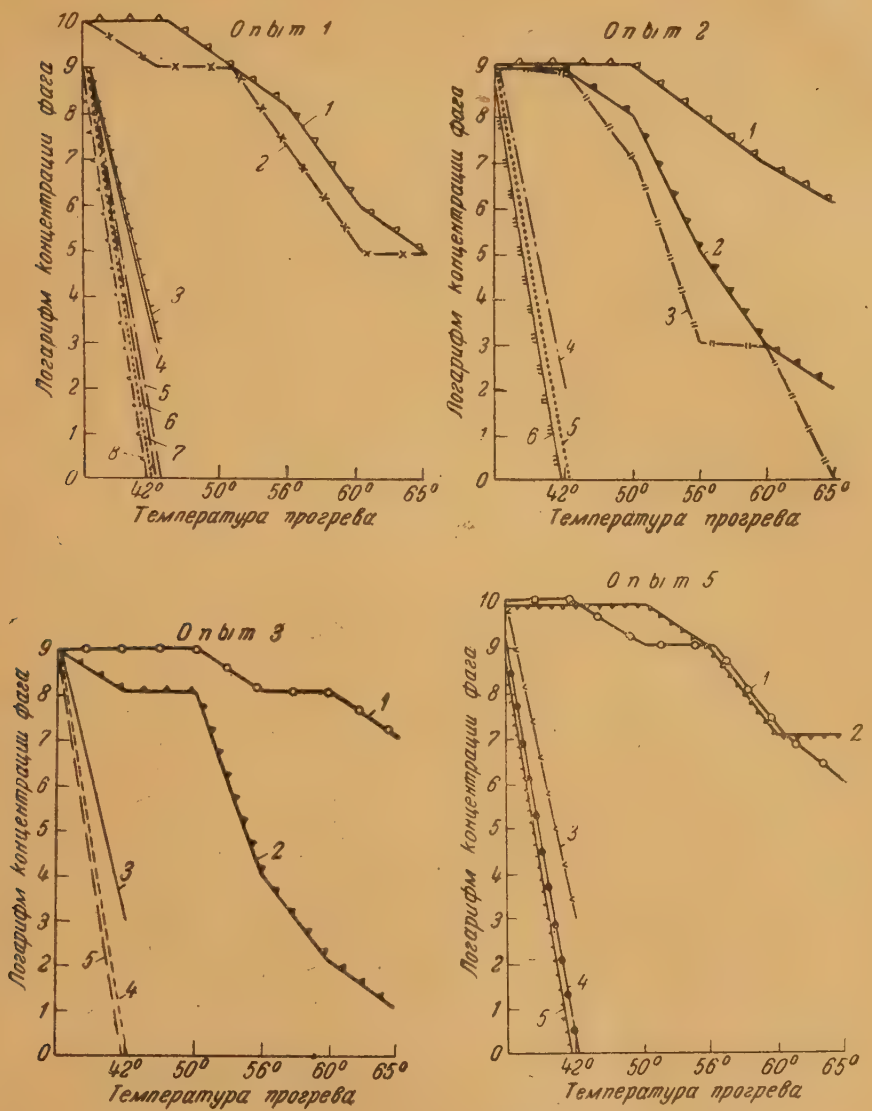



Рис. 3. Устойчивость бактериофага при температурных воздействиях в присутствии защитных коллоидов

Опыт 1. *1* — смесь мелового адсорбционного комплекса с желатиной; *2* — смесь мелового адсорбционного комплекса с агаром; *3* — смесь асканитного элюата с желатиной; *4* — смесь асканитного элюата с агаром; *5* — смесь норитного элюата с желатиной; *6* — смесь норитного элюата с агаром; *7* — смесь мелового элюата с желатиной; *8* — смесь мелового элюата с агаром

Опыт 2. *1* — смесь мелового адсорбционного комплекса с желатиной; *2* — бульонный фаголизат; *3* — смесь мелового адсорбционного комплекса с фильтратом фаголизата; *4* — смесь асканитного элюата с фильтратом фаголизата; *5* — смесь норитного элюата с фильтратом фаголизата; *6* — смесь мелового элюата с фильтратом фаголизата

Опыт 3. *1* — смесь мелового адсорбционного комплекса с сывороткой; *2* — бульонный фаголизат; *3* — смесь асканитного элюата с сывороткой; *4* — смесь норитного элюата с сывороткой; *5* — смесь мелового элюата с сывороткой

Опыт 5. *1* — смесь мелового адсорбционного комплекса с яичным белком; *2* — смесь мелового адсорбционного комплекса с сывороткой; *3* — смесь асканитного элюата с яичным белком; *4* — смесь норитного элюата с яичным белком; *5* — смесь мелового элюата с яичным белком

## Роль защитных коллоидов и антиденатурирующих веществ при высушивании бактериофага

Применение другого мощного денатурирующего белки фактора — высушивания — дало дополнительные материалы для характеристики роли белкового компонента и средств его защиты.

Начиная с Д'Эрелля [11], многие исследователи занимались изучением вопроса об устойчивости бактериофага к высушиванию (Vedder [18], Knorr и Ruf [14], Шеремет и Богачева-Анчевская [10], Ермольева и Якобсон [3], Campbell-Renton [13], Сергиенко [7, 8], Гольдштейн, Френкель и Гинзбург [2], Shade и Caroline [15, 16, 17], Соловьева и Оборина [9], Воробьева [1] и ряд других). Опубликованные данные позволяют судить о том, что степень полноценности сухих препаратов бактериофага определяется методами сушки и свойствами фаголизатов. В известных условиях не трудно сохранить при высушивании исходную концентрацию фага, в других — это не удается. Чувствительность различных бактериофагов к высушиванию может колебаться в широких пределах, так же как и устойчивость высушенных фаголизатов при хранении.

Нет необходимости здесь приводить полностью собственные исследования, начатые еще в конце 1940 г., укажем лишь на некоторые, представляющие, на наш взгляд, определенный интерес.

В одной серии опытов испытывалось влияние способов высушивания: сравнивалась сохраняемость титров бактериофага при высушивании в условиях вакуума и с доступом воздуха.

Через колонку мела весом 10 г профильтровывалось 200 мл поливалентного фаголизата, приготовленного на МПБ из культур дизентерийных палочек Шига, Флекснера — Гисса. После промывания дистиллированной водой адсорбционный комплекс извлекался из воронки, тщательно растирался в ступке и делился на 10 частей. Из них 5 частей высушивалось при температурах 0°; 25; 37; 42 и 60 в условиях вакуума, другие 5 частей — при тех же температурах, но на воздухе. Сухие меловые препараты растворялись в 20 мл воды, к которой добавлялось нужное для растворения мела количество 5 *N* $CH_3COOH$. Титрование производилось по методу Аппельмана на культуре дизентерийной палочки Шига № 915 с регистрацией результатов опытов через 18—20 часов.

Высушивание в условиях вакуума (рис. 4) позволяет сохранить исходную концентрацию бактериофага, адсорбированного на мелу, если проводить сушку при низкой температуре. С повышением ее наблюдается некоторое снижение титров фага в сухих препаратах, однако и при 60° количество активных корпускул бактериофага еще значительно. Здесь нужно принять во внимание, что в процессе сушки испарения влаги сильно понижают температуру в адсорбционном комплексе, она не соответствует показаниям термометра, погруженного в водяную баню, которая служит источником тепла. Это несоответствие температур внутри колбы и вне ее особенно велико в начале сушки и постепенно нивелируется по мере уменьшения упругости водяных паров над меловым адсорбционным комплексом. Последний начинает испытывать возрастающее влияние нагрева, когда процент влажности уже сравнительно невысок.

Сушка с доступом воздуха приводит к инактивации основной массы фаговых частиц. Даже при температуре около 0° высушивание на воздухе сильно уменьшает концентрацию бактериофага в меловых адсорбционных комплексах. Титры бактериофага в них составляли $10^4$, $10^5$. Необходимо признать, что открытая сушка оказывает сильное денатурирующее действие на бактериофаг.

Как показали последующие эксперименты, можно достичь заметного смягчения влияния на фаг высушивания в присутствии кислорода воздуха, если применять защитные коллоиды. В этих опытах меловые адсорбционные комплексы смешивались в различных соотношениях с МПА, мясопептонной желатиной (испытывались различные концентрации агара и желатины), яичным белком и нормальной лошадиной сывороткой. Смеси затем высушивались на воздухе при температуре 37°. В некоторых опытах параллельно определялось защитное действие перечисленных коллоидов на очищенные бактериофаги в условиях высушивания их на воздухе и в вакууме.

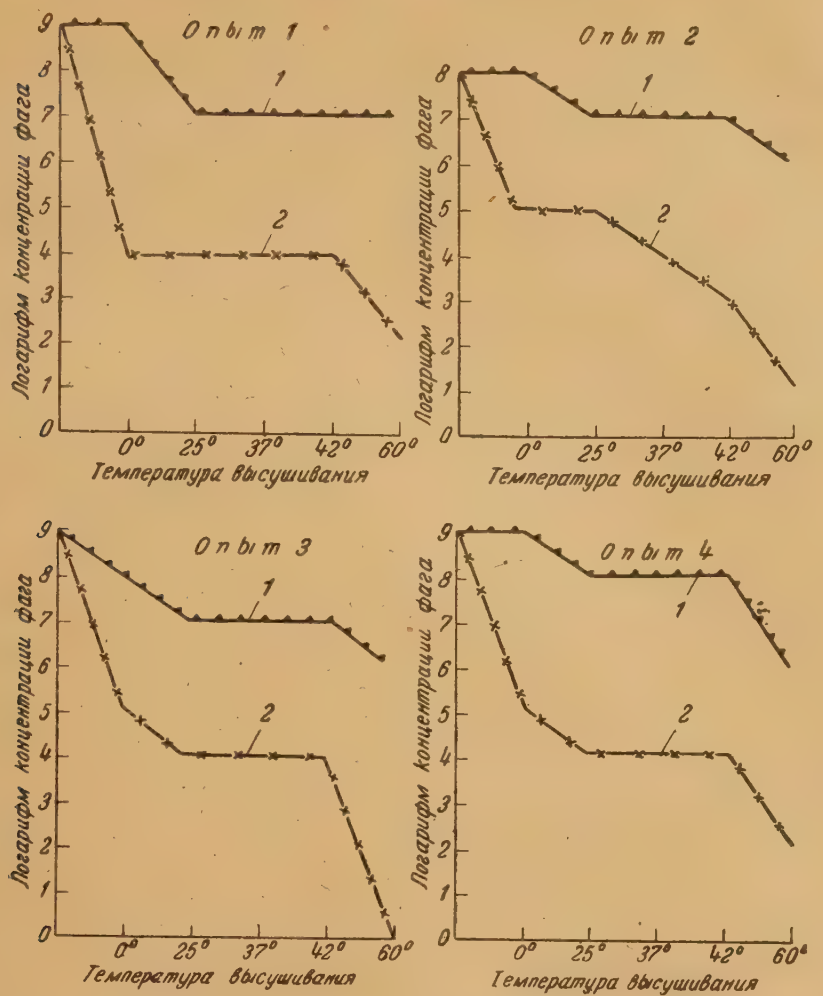



Рис. 4. Высушивание меловых адсорбционных комплексов в условиях вакуума и на воздухе при разных температурах.
*1* — меловой адсорбционный комплекс, высушенный в условиях вакуума; *2* — меловой адсорбционный комплекс, высущенный на воздухе

Через колонку мела весом 10 г было пропущено 200 мл фаголизата дизентерийных палочек Шига, Флекснер — Гисса, приготовленного на МПБ. После промывания дистиллированной водой адсорбционный комплекс был извлечен из воронки, тщательно растерт в ступке и разделен на 5 частей, из которых 1 часть смешивалась с 4 мл расплавленного 2% МПА, 2-я часть — с 4 мл расплавленной 20% мясопептонной желатины, 3-я часть — с 4 мл яичного белка, 4-я часть — с 4 мл нормальной лошадиной сыворотки, 5-я часть — с 4 мл физиологического раствора. Все смеси высушивались в термостате при 37°, а затем, после растворения мела в уксусной кислоте, испытывались на лизис.

Асканитный, норитный и меловой элюаты, в количестве 10 мл каждый, смешивались соответственно с 10 мл тех же коллоидных растворов и делились на 2 части. Одни части высушивались при 37° открытым способом, другие — в условиях вакуума. Сухие остатки растворялись в бульоне, и затем определялся титр бактериофага. Титрование производилось по методу Аппельмана. Регистрация результатов опытов через 18—20 часов.

В табл. 1 приведены данные опытов №№ 8, 9, 10, 11. Они дают представление об оптимальных значениях концентрации коллоидов, применявшихся для защиты адсорбированного на мелу бактериофага от денатурации в процессе открытой сушки. Следует заметить, что в других опытах, в которых менялось соотношение ингредиентов смесей в

Таблица 1

**Устойчивость бактериофага при высушивании в присутствии защитных коллоидов**

| Титры | Опыты | | | |
|---|---|---|---|---|
| | № 8 | № 9 | № 10 | № 11 |
| | Контроль | | | |
| Дизентерийного фаголизата | $10^9$ | $10^9$ | $10^8$ | $10^9$ |
| Высушенного фаголизата | $10^5$ | $10^4$ | $10^5$ | $10^5$ |
| Мелового адсорбционного комплекса до высушивания | $10^9$ | $10^9$ | $10^8$ | $10^{10}$ |
| Мелового адсорбционного комплекса после высушивания | $10^4$ | $10^4$ | $10^4$ | $10^5$ |
| | Защитные коллоиды | | | |
| | С агаром | С желатиной | С белком | С сывороткой |
| Мелового адсорбционного комплекса до высушивания | $10^9$ | $10^9$ | $10^8$ | $10^9$ |
| Мелового адсорбционного комплекса после высушивания | $10^3$ | $10^6$ | $10^7$ | $10^7$ |
| Асканитного элюата до высушивания | $10^8$ | $10^9$ | $10^8$ | $10^9$ |
| » » после высушивания на воздухе | — | — | — | — |
| Асканитного элюата после высушивания в вакууме | — | — | $10^1$ | — |
| Норитного элюата до высушивания | $10^9$ | $10^8$ | $10^8$ | $10^9$ |
| » » после высушивания на воздухе | — | — | — | — |
| Норитного элюата после высушивания в вакууме | — | — | — | — |
| Мелового элюата до высушивания | $10^8$ | $10^8$ | $10^8$ | $10^9$ |
| » » после высушивания на воздухе | — | — | — | — |
| Мелового элюата после высушивания в вакууме | — | — | — | — |

сторону уменьшения или увеличения концентрации коллоидов, результаты получались худшие. Снижение титров в сухих меловых препаратах при избытке защитных коллоидов, возможно, объясняется блокированием активных поверхностей бактериофага, затрудняющим определение истинной концентрации его, остающейся после высушивания. Известно, какую роль играет вязкость среды для проявления литического действия бактериофага.

Несомненное значение защитных коллоидов, смягчающих денатурирующее действие на бактериофаг высушивания на воздухе, отчетливо вырисовывается в проведенных сравнительных опытах. Уменьшение концентрации бактериофага после сушки в одних и тех же меловых адсорбционных комплексах различно в зависимости от того, производилось ли высушивание их в смеси с защитными коллоидами или без них. Титры фага в высушенных меловых адсорбционных комплексах, предварительно смешанных с МПА, желатиной, яичным белком и сывороткой, составляли $10^6$, $10^7$, тогда как комплексы фаг — мел с титрами $10^8$—$10^{10}$, если они не помещались в коллоидные растворы, имели титр после сушки $10^4$ и лишь в одном случае $10^5$.

Высушивание на воздухе в присутствии защитных коллоидов, собственно говоря, и определило известный успех предложенного Сергиенко метода получения сухих препаратов дизентерийного бактериофага.

Яичный белок и нормальная лошадиная сыворотка несколько превосходят по своим защитным свойствам МПА и мясопептонную желатину, однако нужно учесть, что последние создают большую вязкость среды и это могло сказываться на результатах титрования.

Совершенно безуспешным мероприятием оказалось соединение асканитного, норитного и мелового элюатов с коллоидами — титры их в этих смесях после высушивания равнялись нулю. Как и при нагревании, предотвратить инактивацию очищенных бактериофагов от высушивания, даже в условиях вакуума, применением защитных коллоидов — не удается.

Небольшое число опытов было посвящено вопросу о роли так называемых антиденатурирующих веществ в сохранении устойчивости бактериофага при высушивании. В литературе имеется ряд указаний о замедляющем действии на процессы тепловой денатурации белков высоких концентраций солей и других веществ. Что касается бактериофага, то Bronfenbrenner [12] удалось повысить порог тепловой инактивации его с помощью сахарозы и глицерина.

Эти вещества, а также лактоза испытывались в наших опытах. К отдельным частям весом около 2—3 г меловых адсорбционных комплексов (титр их был $10^9$) добавлялось соответственно 2 г сахарозы, 2 г лактозы или 5 мл глицерина. Смеси тщательно растирались, а затем высушивались. Высушивание производилось при различных температурах — 37°, 45° и 60°.

Таблица 2

**Влияние антиденатурирующих веществ на сохранение бактериофага в процессе высушивания на воздухе при разных температурах**

| Титры после высушивания | Опыт № 1 | | | Опыт № 2 | | | Опыт № 3 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Температура высушивания | | | | | | | |
| | 37° | 45° | 60° | 37° | 45° | 60° | 37° | 45° |
| Адсорбционного комплекса | $10^4$ | $10^2$ | $10^1$ | $10^4$ | $10^3$ | — | $10^4$ | $10^3$ |
| Адсорбционного комплекса в смеси с лактозой | $10^5$ | $10^5$ | $10^1$ | $10^6$ | $10^5$ | $10^1$ | $10^5$ | $10^5$ |
| Адсорбционного комплекса в смеси с сахарозой | $10^5$ | $10^4$ | — | $10^4$ | $10^4$ | $10^1$ | $10^4$ | $10^4$ |
| Адсорбционного комплекса в смеси с глицерином | $10^4$ | $10^3$ | $10^1$ | $10^5$ | $10^4$ | — | $10^4$ | $10^3$ |

Как видно из табл. 2, можно достигнуть лучшей сохраняемости титров бактериофага в меловых адсорбционных комплексах после высушивания при температурах 37 и 45°, если добавлять к ним такие вещества, как лактоза. Но ее антиденатурирующее действие выражено в меньшей степени, чем влияние защитных коллоидов.

Попытки повысить устойчивость очищенных бактериофагов к высушиванию прибавлением лактозы, сахарозы и глицерина были оставлены после первых же экспериментов, так как они привели к отрицательным результатам.

## Выводы

Проведенные исследования позволили подойти к решению вопроса о роли белкового компонента бактериофага. Выбранный путь сравнительного определения инактивирующего влияния таких факторов, как температура и высушивание, на неочищенный и очищенные в различной степени фаги оказался весьма полезным. Его успеху способствовали примененный метод отделения фаговых корпускул от окружающих их

в фаголизате веществ и метод фракционирования литического компонента.

Устойчивость литического компонента практически равна нулю, если подвергать его слабому нагреву или высушиванию в условиях вакуума. Вне связи с той субстанцией, которая отделяется в процессе очистки методом фракционированной элюции, сохранить активность литической группы (меловой элюат) или комплекса ее с дериватами второго компонента (асканитный и норитный элюаты) становится невозможным. Даже с помощью защитных коллоидов не удается предотвратить утрату литическим компонентом характерных черт бактериофага от воздействий, не причиняющих никакого ущерба неочищенному фагу.

Двухкомпонентная система — фаговый корпускул — имеет известный предел устойчивости к денатурирующим факторам, температуре и высушиванию. Этот предел зависит не только от природы самого бактериофага, но и от окружающей его среды. Изолированный от субстрата фаголизата адсорбцией на мелу, он становится менее резистентным, и, наоборот, меловые адсорбционные комплексы, помещенные в коллоидные растворы, приобретают устойчивость, значительно превышающую устойчивость бульонного фаголизата. Инактивирующий эффект явно определяется средствами защиты бактериофага, иными словами, степенью его уязвимости. Поскольку защитные коллоиды не влияют на устойчивость литической группы, надо полагать, что они своим присутствием смягчают денатурирующее действие факторов на белковый компонент, обусловливая этим большую термостабильность или резистентность к высушиванию всей системы.

Достаточно сильные, необратимые изменения белкового компонента и состояния его связей с литической группой могут привести к инактивации бактериофага. Эти изменения, в меньшей степени выраженные, как показали дальнейшие исследования, отражаются на литической активности фагового корпускула.

Институт микробиологии
Академии Наук СССР
Москва

*Получено 12.XI.1947*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Воробьева Н. Методика изготовления сухих раневых фагов. Журн. микроб., эпидем. и иммуноб., № 5, стр. 64, 1946.
2. Гольдштейн Б., Френкель Г. и Гинзбург М. Метод получения сухого дизентерийного бактериофага. Журн. микроб., эпидем. и иммуноб., № 10—11, стр. 65, 1944.
3. Ермольева З. и Якобсон Л. Бактериофаг (из книги «Руков. по сывор. и вакц. делу», стр. 88, 1943).
4. Крисс А. К вопросу о природе бактериофага. Микробиология, т. X, стр. 430, 1941.
5. Крисс А. Энзимная природа бактериофага. Успехи совр. биологии, т. 3, стр. 273, 1944.
6. Крисс А. и Рукина Е. О природе бактериофага. II. Очищенный бактериофаг и его свойства. Микробиология, т. XVII, стр. 176, 1948.
7. Сергиенко Ф. Основные принципы методики изготовления дизентерийного бактериофага в сухом виде на плотной питательной среде. Журн. микроб., эпидем. и иммуноб., № 4—5, стр. 4, 1943.
8. Сергиенко Ф., Михельсон Р. и Колядицкая Л. К вопросу о методике изготовления полноценных препаратов сухого дизентерийного фага на плотной питательной среде. Журн. микроб., эпидем. и иммуноб., № 10, стр. 3, 1946.
9. Соловьева Т. и Оборина В. К методике изготовления сухого бактериофага (из книги «Сб. работ Молотовск. ин-та эпид. и микроб.», стр. 35, 1945).
10. Шеремет П. и Богачева-Анчевская М. Опыт получения сухого бактериофага и изучение его свойств. Журн. микроб., эпидем. и иммуноб., т. 21, стр. 108, 1938.
11. Д'Эрелль. Бактериофаг и его значение для иммунитета. Москва, 1926 (перевод).
12. Bronfenbrenner J. The heat inactivation of bacteriophages. Proc. Soc. Exp. Biol., v. 29, p. 802, 1932.
13. Campbell-Renton M. L. Experiments on drying and freezing bacteriophage, J. Path. Bact., v. 53, p. 371, 1941.

14. Knorr M. u. Ruf H. Phagtrocknung und Phagauswertung. Ctbl. Bakt., I Abt., Bd. 133, S. 289, 1935.
15. Shade A. and Caroline L. The preparation of a polyvalent dysentery bacteriophage in a dry stable form I. Preliminary investigations and general procedures. J. Bact., v. 46, p. 463, 1943.
16. Shade A. a. Caroline L. II. Factors affecting the stabilization of dysentery bacteriophage during lyophilization. J. Bact., v. 48, p. 179, 1944.
17. Shade A. a. Caroline L. III. Stability of the dried bacteriophage towards heat, humidity, age and acidity. J. Bact., v. 48, p. 243, 1944.
18. Vedder A. Die Hitzeresistenz von getrockneten Phagen. Ctbl. Bakt., I, Orig., Bd. 125, S. 111, 1932.

# РОЛЬ ПРОТОПЕКТИНАЗЫ В ИНФЕКЦИОННОМ ПРОЦЕССЕ У РАСТЕНИЙ

*Н. А. Шишелова*

Основным теоретическим вопросом в области изучения бактериальных заболеваний растений является вопрос о сущности инфекционного процесса. Несомненно, что возникновение и течение инфекционного процесса зависят от многих факторов.

В настоящее время мы еще не умеем изучать влияние этих факторов в их совокупности, поэтому приходится ограничиваться исследованием отдельных вопросов, приближающих нас к пониманию сущности проблемы в целом, но не расшифровывающих ее полностью. Одним из таких вопросов является изучение особенностей ферментного комплекса фитопатогенных бактерий, в частности зависимости между паразитическими свойствами организма и наличием у них пектинразлагающих ферментов.

Уже начиная с прошлого столетия, многие авторы указывали на существование такой зависимости для возбудителей гнили. Однако эта точка зрения не получила широкого признания, так как работы, проведенные в этом направлении, сводились главным образом к констатации наличия этих ферментов у фитопатогенных организмов, что само по себе еще не выясняет их значения для проявления вирулентных свойств, с другой стороны, пектинразлагающие ферменты обнаружены у организмов, которые не считались фитопатогенными, что опровергало указанную точку зрения.

Основной задачей нашей работы являлось выяснение роли протопектиназы в инфекционном процессе, вызываемом фитопатогенными бактериями. Несомненно, что из всего комплекса пектинразлагающих ферментов наибольший интерес представляет протопектиназа. Этот фермент вызывает первую стадию разложения протопектина — мацерацию растительной ткани.

Для разрешения поставленной задачи изучались различные группы организмов, но основным объектом изучения явились возбудители гнили. Кроме того, были проведены опыты со специфическими фитопатогенными бактериями, вызывающими пятнистости, и сапрофитными формами, в числе которых изучались представители группы Bact. coli и почвенные спороносные бактерии.

## Возбудители мягкой бактериальной гнили

Возбудители мягкой бактериальной гнили занимают своеобразное положение среди фитопатогенных бактерий. В литературе описано большое количество видов возбудителей гнили под различными наименованиями, однако при ближайшем рассмотрении многие исследователи приходят к выводу, что все это варианты одной группы, представителем которой является Bac. carotovorus. Они отличаются от специфических паразитов чрезвычайной вариабальностью своих свойств, включая сюда и вирулентность. Весьма характерна их способность заражать разнообразные растения, принадлежащие к различным семействам. Ряд авторов указывает на их близкое родство с группой Bact. coli, т. е. с сапрофитной формой. Ареал их распространения

чрезвычайно широк, и удавалось констатировать их присутствие в почве, тогда как специфические бактерии не способны сохраняться в почве вне органических остатков.

Таким образом, группу возбудителей гнили следует рассматривать как факультативных паразитов, приобретающих в особых условиях способность поражать растение. Соответственно этому следует предположить, что и механизм их действия значительно проще, чем механизм действия специфических паразитов.

Jones [9], изучая различных возбудителей бактериальной мягкой гнили, установил у всех испытанных организмов способность мацерировать растительные срезы.

Впервые мы столкнулись с возбудителями мягкой гнили при изучении бактериоза семенников капусты (Старыгина и Шишелова [5]). Выделенные нами культуры несколько отличались между собой по своим биохимическим признакам, но в основном наметились две группы организмов: I группа, приближающаяся к Bac. carotovorus, и II группа, объединявшая культуры, не вполне идентичные между собой и являвшиеся скорее переходными формами от сапрофитов к Bac. carotovorus.

Выделенные нами организмы обращали на себя внимание высокой интенсивностью заражения и исключительно коротким инкубационным периодом. Для констатации способности выделять протопектиназу были использованы различные методы применительно к наиболее активным культурам.

Оказалось, что ломти растительных тканей, изолированные от непосредственного воздействия бактерий слоем агара, разлагаются в результате диффузии веществ, выделяемых бактериями. Десятидневные бульонные культуры производили мацерацию срезов в течение 3—4 часов. В «ферментных растворах» (последние получались в результате осаждения 80% спиртом 10-дневной бульонной культуры с последующим растворением осадка в воде) мацерация протекала еще более быстро, в отдельных случаях в 15—20 минут. В растворах, инактивированных нагреванием, мацерации не было.

Таким образом, мы убедились, что наиболее активные представители выделенных нами возбудителей продуцируют протопектиназу. В дальнейшем, при проверке всех имевшихся у нас культур, мы встретились с неожиданными для нас результатами: оказалось, что бульонные культуры второй группы не производили мацерации ткани (табл. 1).

Таблица 1

**Мацерация срезов клубня картофеля бульонными культурами возбудителей гнили семенников капусты**

| № культуры | I группа | | | | | II группа | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 13 | 46 | 47 | 1 | 2 | 76 | 77 | 84 | 89 | 104 | 269 | 270 | 271 |
| Мацерация . . . . . | + | + | + | + | + | — | — | — | — | — | — | — | — |

Примечание. + наличие; — отсутствие.

Результат был неожиданным уже потому, что при опытах с разложением тканей через агаровую прослойку мы получали положительный эффект с представителями II группы. Кроме того, характер вызываемого ими поражения растений был совершенно идентичен тому, что давала группа I. Следовательно, мы не имели никаких оснований предполагать, что механизм действия этих двух групп бактерий чем-либо отличается. Необходимо отметить, что с момента выделения культур и первых ориентировочных опытов прошло около полугода, поэтому ве-

роятнее всего было предположить, что в результате культивирования в лабораторных условиях ферментативная активность культур группы II в отношении протопектина была утеряна. Но если это действительно имело место и если существует связь между способностью выделять протопектиназу и вирулентностью, то эти культуры, утратившие способность продуцировать протопектиназу, не должны были заражать растительные ткани. В связи с этим были вновь проведены опыты с заражением растительных тканей (табл. 2).

Таблица 2

**Влияние культивирования в лабораторных условиях на вирулентность возбудителей бактериоза семенников капусты**

| № группы | № культуры | Дата выделения | Ломти картофеля | | Ломти кочерыг | | Капустная рассада | | Побеги картофеля | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | свежевыделенные культуры | культуры по прошествии 6—12 мес. | свежевыделенные культуры | культуры по прошествии 6—12 мес. | Лето | | | |
| | | | | | | | 1945 | 1946 | 1945 | 1946 |
| | | | Степень поражения | | | | | | | |
| I | 13 | 23/IX 1944 | + | + | + | + | 2 | 1 | 0 | 0 |
| | 46 | 11/X 1944 | + | + | + | + | 4 | 4 | 0 | 0 |
| | 47 | 11/X 1944 | + | + | + | + | 4 | 4 | 0 | 0 |
| | 1 | 18/VII 1945 | + | + | + | + | 4 | 4 | 4 | 4 |
| | 2 | 18/VII 1945 | + | + | + | + | 4 | 4 | 4 | 4 |
| II | 76 | 11/I 1944 | + | + | + | — | 1 | 1? | — | 0 |
| | 77 | 11/I 1944 | + | + | + | — | 2 | 1? | — | 0 |
| | 84 | 3/XI 1944 | + | + | + | — | 3 | 1? | — | 0 |
| | 89 | 3/XI 1944 | + | + | + | — | 2 | 1? | — | 0 |
| | 104 | 3/XI 1944 | + | + | + | — | 2 | 2? | — | 0 |
| | 269 | 9/VI 1945 | + | + | + | — | 0 | 0 | — | 0 |
| | 270 | 9/XI 1945 | + | + | + | — | — | 1? | — | 0 |
| | 271 | 9/XI 1945 | + | + | + | — | 5 | 1? | 4 | 0 |
| | Контроль | | — | — | — | — | 0 | 0 | 0 | 0 |

Проверочное заражение показало, что действительно частичная утрата вирулентности была налицо. Культуры перестали заражать капустную рассаду и ломти кочерыг. Даже № 271, дававший в свежевыделенном состоянии наиболее интенсивное поражение и заражавший не только капусту, но и побеги картофеля, также оказался неактивным. Однако все культуры сохранили способность разлагать ломти картофеля. Сок пораженного картофеля производил мацерацию срезов картофеля и капусты в течение $2^1/_2$ часов, т. е. в пораженных тканях протопектиназа присутствовала. Дальнейшие опыты показали, что культуры, утерявшие способность выделять протопектиназу, при выращивании их на капустном отваре также оставались неактивными, но на картофельном отваре выделение фермента имело место.

Таким образом, стало очевидным, что и в случае поражения растения культурами группы II, протопектиназа играет определенную роль, более того, ослабление ферментативной активности влечет за собой ослабление вирулентности.

### Действие препарата протопектиназы на растительные ткани

Для того, чтобы получить боле ясное представление о роли пектинразлагающих ферментов в инфекционном процессе, мы пытались расчленить действие живых бактерий и фермента при заражении зеленого растения.

С этой целью на пораженные листочки капустной рассады был нанесен препарат, полученный при помощи осаждения спиртом культуральной жидкости наиболее активных культур (№ 2 и № 46). Для осаждения была взята месячная культура, выращенная на картофельном отваре. Сухой порошок увлажнялся дистиллированной водой до консистенции жидкой кашицы и в таком виде переносился на листочки растения. Сверху для предохранения от высыхания накладывалась ватка, смоченная водой. Контролем служил осадок из стерильного картофельного отвара.

Растения с нанесенным осадком были помещены в камеры при 30°. По прошествии одного часа вокруг уколов появились отчетливые влажные зоны. Через 2 часа многие зараженные листочки поникли, а уже через 3 часа общий вид растений был таков, как это наблюдается на 2—3-е сутки при заражении живыми бактериями: на всех листьях наблюдались огромные влажные пятна, листья поникли и при прикосновении нередко легко отделялись от черешка. Хотя контрольные высевы осадков обнаружили, что в процесе осаждения спиртом бактерии полностью не погибают и на 2-е сутки на чашках с МПА мы наблюдали хороший рост исходных культур, однако быстрота заболевания растения исключает возможность объяснения полученного эффекта развитием живых бактерий. Несомненно, что в данном случае мы наблюдали действие фермента без участия живых организмов. Опыт был проведен дважды с одинаковыми результатами.

При обычном заражении растений мы вносим вместе с культурой значительное количество готового фермента, накопленного при выращивании культуры на искусственной среде, и создаем тем самым исключительно благоприятные условия для проникновения бактерий. Нас интересовало, как будут вести себя бактерии на растении без наличия предварительно накопленного фермента. Устранить фермент из бактериальных суспензий, служащих для заражения, не представляло никаких затруднений, поскольку мы имели дело с термостабильными организмами, выдерживающими высокие температуры.

Опыт был поставлен по следующей схеме: 24-суточные агаровые культуры прогревались при 70° 10 минут. Прогретые суспензии, как показали контрольные опыты, с мацерацией растительных срезов теряли ферментативную активность, но сохраняли жизнеспособные клетки, дававшие нормальный рост на косом агаре через 48 часов. Кусочки ваты, смоченные такими суспензиями, накладывались на пораженные листочки. Растения выдерживались в камерах при температуре 26—30°. Контролем являлась непрогретая водная суспензия, производящая полную мацерацию срезов по истечении 3 часов. Конечно, такой контроль не являлся безупречным, ибо, помимо фермента, он содержал значительно большее количество посевного материала. Так как полностью устранить этот недостаток нам не представлялось возможным, был введен вариант с прогретой бульонной суспензией с целью создать благоприятные условия для быстрого размножения бактерий.

Как и следовало ожидать, присутствие фермента в бактериальной суспензии способствует быстроте и интенсивности распространения поражения. Однако в благоприятных условиях для размножения и образования фермента (вариант с бульонной суспензией) заражение растения инактивированной суспензией также дает хороший эффект. Вариант с заражением рассады прогретой водной суспензией, где культура не имела условий для быстрого размножения, а следовательно, и для накопления фермента на поверхности листа, обнаружил значительное отставание в развитии инфекционного процесса (табл. 3).

Суммируя результаты данного раздела, мы пришли к выводу, что одним из основных факторов вирулентности у возбудителей бактериоза семенников капусты является наличие у организмов протопектиназы.

Таблица 3

**Заражение капустной рассады прогретыми культурами**

| № культуры | Способ заражения | Наличие пектин разлаг. фермента в бактер. суспензии | Наличие жизнеспособн. клеток в бактер. суспензии | Состояние растения через 48 часов |
|---|---|---|---|---|
| 46 | Водная суспензия без прогревания | + | + | Очень сильное заражение. Листья опадают |
| | Водная суспензия, прогретая 10 мин. при 70° | — | + | Начало заражения. Ореолы вокруг уколов |
| | Бульонная суспензия, прогретая 10 мин. при 70° | — | + | Сильное заражение. Большие влажные пятна |
| 47 | Водная суспензия без прогревания | + | + | Сильное заражение. Большие влажные пятна. Несколько листьев опало |
| | Водная суспензия, прогретая 10 мин. при 70° | — | + | Начало заражения. Ореолы вокруг уколов |
| | Бульонная суспензия, прогретая 10 мин. при 70° | — | + | Большие ореолы вокруг уколов. Почернение жилок |
| 2 | Водная суспензия без прогревания | + | + | Сильное заражение. Большие влажные пятна |
| | Водная суспензия, прогретая 10 мин. при 70° | — | + | Начало заражения. Ореолы вокруг уколов |
| | Бульонная суспензия, прогретая 10 мин. при 70° | — | + | Большие влажные пятна вокруг уколов |

## Протопектиназа специфических фитопатогенных бактерий

В природе встречаются различные типы поражения растений: гнили, пятнистости, ожоги, увядания и образование опухолей. Вероятно, каждый из этих типов связан со своеобразным механизмом действия паразита. По внешнему проявлению наиболее близкими к гнили можно считать пятнистости растений. Играют ли в данном случае какую-либо роль пектинразлагающие ферменты или разложение растительных тканей идет совершенно иными путями, в настоящее время совершенно не известно.

Относительно типичных специфических фитопатогенных бактерий мы не располагаем какими-либо сведениями об их способности разлагать пектиновые вещества. Мы не встретили никаких литературных указаний в этом направлении, за исключением работы Wolf [13], изучавшего разложение пектина в искусственных средах Xanth. campestre, Pseud. tabacum, Pseud. angulatum, Pseud. sojae и Bac. carotovorus, и краткого указания Smith [12] о растворении Xanth. campestre срединной пластинки клеточных стенок, обнаруженного им на срезах турнепса. Специализированные паразиты по своим свойствам существенно отличаются от возбудителей гнили. Несомненно, что у этих организмов степень приспособленности к паразитическому существованию выражена более отчетливо, чем у группы Bac. carotovorus, и можно предполагать, что они обладают более сложным аппаратом для воздействия на растение.

Получить хотя бы неполное освещение этого вопроса представляло несомненный интерес. В связи с этим мы пытались выяснить наличие пектинразлагающих ферментов у некоторых фитопатогенных бактерий, из группы Xanthomonas.

Внешние признаки проявления сосудистого бактериоза крестоцветных, вызываемого Xanth. campestre, весьма напоминают мягкую гниль семенников капусты. С другой стороны, по своим культуральным и биохимическим свойствам Xanth. campestre очень близок к таким облигатно-специфическим паразитам, как Xanth. phaseoli и Xanth. malvacearum,— возбудителям пятнистости фасоли и хлопчатника. Эти три организма и были выбраны нами в качестве объектов для изучения.

Xanthomonas campestre. Аналогично опытам с возбудителями гнили Xanth. campestre выращивался на различных средах, затем в культуральную жидкость погружались бритвенные срезы растительных тканей и велись наблюдения за мацерацией последних.

Способность Xanth. campestre выделять протопектиназу была проверена на следующих средах: МПБ, картофельный отвар, стерильные листья капусты, стерильные семена фасоли, сырые листья капусты. Во всех случаях мы обнаружили отчетливую мацерацию растительных тканей.

Десятиминутное прогревание при 70° инактивировало культуральную жидкость. При осаждении МПБ и картофельного отвара спиртом мы получили тот же эффект, что и с возбудителями бактериоза семенников капусты, за исключением того, что высев осадка на МПА не обнаружил роста Xanth. campestre. Однако по сравнению с наиболее активными возбудителями гнили мацерация, производимая ферментом Xanth. campestre, протекала более медленно.

Более слабое действие наблюдалось и при нанесении осажденного фермента на листья капустной рассады. Поражение ограничивалось влажными зонами вокруг уколов и не достигало той интенсивности, которую дает заражение живыми бактериями.

Все имевшиеся у нас культуры Xanth. campestre, независимо от их происхождения, оказались в той или иной степени способными выделять протопектиназу. Однако Xanth. campestre в отличие от возбудителей гнили способен заражать только растения из семейства крестоцветных, следовательно, наличие протопектиназы у организма, несмотря на ее существенную роль, не определяет полностью вирулентность организма. Возможно, что большое значение имеет строение пектина того или иного растения и соответственно приспособленность возбудителя усваивать продукты его первоначального распада. С другой стороны, необходимо считаться со способностью паразитов преодолевать защитные реакции самих растений. Указанные вопросы еще настолько мало разработаны, что в настоящее время чрезвычайно трудно притти к определенному выводу по поводу доминирующего значения того или иного фактора в каждом отдельном случае.

Xanthomonas phaseoli. Для выращивания Xanht. phaseoli применялись: МПБ, стерильная капустная среда, стерильная картофельная среда и стерильные семена фасоли. Несмотря на пышный рост, ни на одной из стерильных сред Xanth. phaseoli не выделял протопектиназы.

Предположив, что пектиновые вещества растительной ткани претерпевают изменения при стерилизации, и возможность того, что некоторым организмам для образования фермента необходим протопектин в неизмененной форме, мы предприняли опыты с заражением свежих семян фасоли. Наиболее сильно пораженные экземпляры семян растирались в фарфоровой ступке и отжимались через марлю. В полученную кашицу помещались срезы картофеля, капусты и семядолей фасоли и выдержи-

вались при 40°. Контролем служили аналогично обработанные семена фасоли без заражения Xanth. phaseoli.

В испытуемом варианте через короткий срок срезы обнаружили явные признаки мацерации. Аналогичный результат получен с соком листьев фасоли, зараженной нами Xanth. phaseoli. Срезы, помещенные в кашицу из растертых тканей пораженных участков, совершенно распадались через $1^1/_2$ часа при полном отсутствии эффекта с соком здоровых листьев.

Xanthomonas malvacearum. Xanth. malvacearum выращивался на МПБ, картофельном отваре, стерильных кусочках картофеля и капусты и стерильных семенах хлопчатника с предварительно удаленной оболочкой. Во всех случаях наблюдался прекрасный рост культуры, однако, так же как для Xanth. phaseoli, мацерация растительных срезов отсутствовала. Ни попытка выделить фермент путем осаждения спиртом (МПБ и картофельный отвар), ни удлинение сроков инкубации до $1^1/_2$ месяцев не помогли обнаружить протопектиназы. Только в соке искусственно зараженных листьев хлопчатника по прошествии 5 часов обнаружились признаки мацерации растительных срезов.

Итак, все три организма обладали способностью выделять протопектиназу, но условия, необходимые для проявления этой способности, и степень их активности в этом направлении были различны (табл. 4).

Таблица 4

**Влияние различных сред на образование пектинразлагающего фермента Xanth. campestre, Xanth. phaseoli, Xanth. malvacearum**

| Название культур | Состав среды | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | МПБ | Картофельный отвар | Стерильный картофель | Стерильная капуста | Стерильные семена фасоли | Стерильные семена хлопчатника | Сок пораженных листьев растения-хозяина |
| Xanth. campestre | + | + | | + | + | | + |
| » phaseoli | — | — | — | — | — | | + |
| » malvacearum | — | — | — | — | | — | + |

Наиболее нетребовательным оказался Xanth. campestre, выделявший фермент на всех испытанных средах, независимо от присутствия пектина. Два других организма не выделяли фермента не только в отсутствие пектиновых веществ, но и при наличии их в стерильных средах. Даже на кашице, приготовленной из растения-хозяина, подвергнутой горячей стерилизации, ферментативная активность не проявлялась. Необходимым условием для образования фермента Xanth. phaseoli и Xanth. malvacearum является присутствие неизмененного протопектина растения, но даже при этих условиях ферментативная деятельность Xanth. malvacearum проявляется очень слабо, что заставляет предполагать, что образование фермента этим организмом имеет еще не учтенные нами особенности.

### Протопектиназа сапрофитных бактерий

В наших исследованиях объектами для изучения явились:

А) Группа почвенных споровых бактерий, относительно которых краткие литературные указания не проливают достаточного света в смысле выяснения природы их паразитического действия.

Б) Группа кишечной палочки, согласно литературным данным являющаяся родственной возбудителям мягкой гнили.

## А. Почвенные спороносные бактерии

До сих пор относительно патогенности споровых бактерий очень мало достоверных данных, поэтому в настоящий момент в списке признанных паразитов споровые формы отсутствуют. Однако за последние годы начали появляться работы, указывающие на необходимость серьезного изучения споровых бактерий с точки зрения их способности вызывать гнили растительных тканей [11]. Эта группа аналогично возбудителям гнилей содержит бесчисленное количество близких видов, представляющих значительное затруднение при их идентификации, что обусловливает разногласия среди исследователей при проверке патогенности отдельных видов. Патогенность Bac. mesentericus в отношении клубней картофеля констатирована Бельтюковой [2], Brierley [17], тыквы — Бургвицом [4] и абрикоса — Авакян [1]. Dowson [8] указывает на способность Bac. polymyxa поражать картофель, морковь, лук, огурцы и ирис. Madhock [10] из гниющих плодов томатов выделил вирулентный споровой организм, названный им Bac. frutodestruens.

Согласно Allen [6], Bac. subtilis, присутствующий в мочильной жидкости, способен выделять пектинразлагающие ферменты и вызывать гниль овощей и мочку льна. Березова [3] еще в 1935 г. констатировала патогенность Bac. macerans по отношению ко льну. Эти данные послужили нам основанием для попыток выяснить присутствие пектинразлагающих ферментов у почвенных споровых бактерий и их вирулентность в отношении растений. При этом мы ориентировались на организмы, выделенные непосредственно из почвы, а не из каких-либо образцов пораженных растений, так как мы стремились выяснить вирулентность культур, обладающих протопектиназой, но не имевших возможности приспособиться к паразитическому существованию.

Культуры были получены нами из лаборатории почвенных микроорганизмов Института микробиологии Академии Наук СССР. Из 16 полученных культур 7 принадлежало к Bac. mycoides, 5 — Bac. mesentericus и 4 — Bac. mesentericus, приближающихся по всем культуральным свойствам к Bac. subtilis; помимо того, была проверена также коллекционная культура Bac. mycoides, хранившаяся в нашей лаборатории.

Прежде всего была испытана способность культур выделять протопектиназу при выращивании их на стерильной картофельной среде в течение 10 суток. Быстрая мацерация срезов (полный распад тканей через $1^1/_2$ часа) наблюдалась только у типичного Bac. mesentericus. У остальных культур по прошествии 6 часов мацерация отсутствовала, за исключением слабой реакции у № $\frac{\text{Роз}}{50}$. Происхождение микроорганизмов не играло никакой роли, т. е. все испытанные культуры Bac. mesentericus, независимо от источника выделения, оказались способными производить мацерацию и, с другой стороны,— все культуры Bac. mycoides и варианты, приближающиеся к Bac. subtilis, этой способностью не обладали, за исключением коллекционной культуры Bac. mycoides № 1. Опыт был повторен дважды с аналогичными результатами. Параллельно производились опыты заражения капустной рассады (табл. 5).

Оказалось, что заражать зеленое растение могут только те культуры, которые в данный момент обладают способностью активно выделять протопектиназу. Культуры с пониженной ферментативной деятельностью ($\frac{\text{Роз}}{50}$, А) разлагают ломти картофеля и капустных листьев, но рассаду не поражают.

Таблица 5

**Зависимость между наличием протопектиназы и патогенностью у почвенных споровых бактерий**

| № культуры | Наименование бактерий | Источник выделения | Мацерация растительных срезов | Заражение лоитей картофеля | Заражение капустных листьев | Степень заражения капустной рассады |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 118/3 | Bac. mesentericus | Почва южн. Киргизии | + | + | + | 2 |
| 118/5 | | То же | + | + | + | 1 |
| Нов./40 | | Соликамская почва | + | + | + | 3 |
| г | | То же | + | + | + | 3 |
| 12 к | | » » | + | + | + | 4 |
| Роз/50 | Термотолерантные варианты Bac. mesentericus, приближающиеся к Bac. subtilis | » » | +? | + | + | 0 |
| А | | » » | +? | + | + | 0 |
| 1 | | » » | — | — | — | 0 |
| $P_5$ | | » » | — | — | — | 0 |
| 79/А | Bac. mycoides | Игарская почва | — | — | — | 0 |
| 133 | | То же | — | — | — | 0 |
| 324 | | » » | — | — | — | 0 |
| Моск. | | Почва Моск. области | — | — | — | 0 |
| П/а | | Почва Ср. Азии | — | — | — | 0 |
| 71/3 | | То же | — | — | — | 0 |
| $P_4$ | | Почва Ростов н/Д | — | — | — | 0 |
| № 1 | | Коллекционный штамм | + | — | + | 1 |

Примечание. + наличие; — отсутствие.

Протопектиназа обнаружена нами в основном у представителей типичного Bac. mesentericus. Однако вирулентные варианты можно встретить и у Bac. mycoides (коллекционная культура).

При помощи спиртового осадка, полученного из культуральной жидкости Bac. mesentericus, как и для возбудителей гнили, удавалось воспроизводить заболевание капустной рассады в течение нескольких часов.

Способность представителей споровых почвенных организмов заражать зеленое растение является чрезвычайно интересным фактом; но возникает вопрос, почему при таком широком распространении этих организмов в почве они только в отдельных случаях отмечены как возбудители гнили растений.

Вероятнее всего, что источником недооценки паразитических способностей этой группы служит то, что патогенность ее представителей является малоустойчивой, требующей для своего проявления сочетания определенного комплекса условий. Во всяком случае способность к паразитическому существованию почвенных споровых бактерий, так же как у возбудителей гнили, связана с наличием протопектиназы.

## Б. Группа кишечной палочки

Выше уже указывалось, что многие исследователи, основываясь на биохимической характеристике группы возбудителей гнили, рассматри-

вают их как организмы, близкие Bact. coli. Исходя из этих данных, мы также предприняли изучение способности Bact. coli мацерировать растительные ткани и заражать ломти картофеля, капусты, а также капустную рассаду. 11 культур Bact. coli были получены нами из Института им. Эрисмана. Среди них имелись как типичные представители Bact. coli, так и атипичные формы.

Ни одна из имевшихся у нас культур не проявила ферментативной активности в отношении протопектина и не заражала ни клубней картофеля, ни листьев капусты, ни зеленого растения.

Таким образом, подводя итог всем проведенным нами исследованиям, мы приходим к выводу, что все испытанные нами организмы, способные заражать растения, обладали протопектиназой, и все организмы, обладающие протопектиназой, при определенных условиях могут в той или иной форме поражать растение.

## Выводы

1. Одним из основных факторов вирулентности возбудителей бактериоза семенников капусты является наличие у организмов протопектиназы.

2. Устойчивость возбудителей мягкой гнили в отношении сохранения ферментативной способности разлагать протопектин различна. Имеются культуры, быстро теряющие способность выделять протопектиназу, несмотря на большую активность в свежевыделенном состоянии. С другой стороны, у ряда возбудителей (группа I) активность сохранялась в течение 2 лет без заметных признаков ослабления.

3. Потеря способности выделять протопектиназу влечет за собой потерю вирулентности.

4. При нанесении препарата пектинразлагающих ферментов на листья растения удается воспроизводить характерную картину поражения зеленого растения в течение нескольких часов.

5. Устранение протопектиназы из бактериальной суспензии, служащей для заражения зеленого растения, вызывает торможение развития заболевания.

6. У облигатно-специфических паразитов, как Xanth. phaseoli и Xanth. malvacearum, способность образовывать протопектиназу обнаруживается только при культивировании организмов на живых растительных тканях и у Xanth. malvacearum выражена слабо. На стерильных искусственных средах выделение фермента отсутствует. Xanth. campestre образует протопектиназу на всех искусственных средах, независимо от присутствия в последних пектиновых веществ.

7. Наличие протопектиназы у некоторых специфических паразитов из рода Xanthomonas (Xanth. campestre, Xanth. phaseoli и Xanth. malvacearum) заставляет предполагать, что, несмотря на более сложный механизм действия, имеющий место при специфических поражениях, и в этих случаях разложение пектина является необходимым условием для развития и распространения заболевания.

8. Зависимость между наличием протопектиназы и способностью организмов поражать растительные ткани достаточно четко выявилась также и при изучении сапрофитных бактерий: Bact. coli, неспособный выделять протопектиназу, не поражает растительные ткани.

Отдельные культуры почвенных споровых бактерий (главным образом Bac. mesentericus) обладают ферментативной активностью, и только эти культуры способны заражать зеленое растение.

Всесоюзный институт сельскохозяйственной микробиологии
Московское отделение

*Получено 7.VII.1947*

## ЛИТЕРАТУРА


1. Авакян С. А. Бактериальное побурение абрикоса. Микробиологический сборник АН Арм. ССР, вып. II, 49, 1946.
2. Бельтюкова К. І. Вплив яровизації картопляных бульб на підвищення несприйнятливості іх до зароження гнильними бактеріями. Мікробіологічний журнал. АН УССР, т. V, № 2, стр. 153, 1938.
3. Березова Е. и Савчинкова М. Бактериальные болезни льна. Микробиология, т. IV, вып. 1, 103, 1935.
4. Бургвиц Г. К. Бактериальное поражение цветов тыквы. Болезни растений, XVI, № 1, 43, 1927.
5. Старыгина Л. П. и Шишелова Н. А. Бактериоз семенников капусты. Доклады ВАСХНИЛ, № 5, 19, 1947.
6. Allen L. A. Spore-forming bacteria causing soft-rot of potato and retting of flax. Nature, v. 153, No. 3877, p. 224, 1944.
7. Brieley P. Patogenecity of Bacillus mesentericus, B. aroideae. B. carotovorus and B. phytophthorus to potato tubers. Phytopath., v. 18, p. 819, 1928.
8. Dowson W. J. Spore-forming bacteria in potatoes. Nature, v. 152, No. 3855, p. 331, 1943.
9. Jones L. R. The bacterial soft rots of certain vegetables. II. Pectinase the cytolytic enzyme produced by Bacillus carotovorus and certain other soft-rot organisms. N. Y. Agr. Exp. Stat. Bull. Tech., No. 11, 291, 1909.
10. Madhok M. R., Ud-Din F. Bacterial soft rot of tomatoes caused by a spore-forming organism. Indian J. agric. Sci., XIII, No. 2, 129, 1943.
11. Spore-forming bacteria pathogenic to plants. Nature, v. 154, No. 3913, p. 557, 1944.
12. Smith Erw. Fr. The Effect of black rot on turnips. U. S. Dept. Agr. Bur. Pl. Ind. Bull., 29, 9, 1903.
13. Wolf F. A. Studies on the physiology of some plant pathogenic bacteria; VII. Pectic fermentation in culture media containing pectin. Phytopath., v. 13, p. 381, 1923.

# ВЛИЯНИЕ ГРАМИЦИДИНА С НА МОРФОЛОГИЮ И ФИЗИОЛОГИЮ МИКРОБОВ

## I. ВЛИЯНИЕ ГРАМИЦИДИНА С НА МОРФОЛОГИЮ СТАФИЛОКОККОВ И КАРТОФЕЛЬНОЙ ПАЛОЧКИ

*Н. В. Крупин*

В связи с практическими задачами использования антибиотиков для борьбы с микроорганизмами внимание микробиологов сосредоточено главным образом на изучении их бактерицидных и бактериостатических свойств. Вопросами о каких-либо других результатах действия антибиотиков на микробов исследователи почти не занимаются.

Между тем нет достаточных оснований считать, что бактерицидный или бактериостатический эффект является при всех условиях единственным результатом взаимодействия между микробами и антибиотиками. Нам кажется более правильным рассматривать этот эффект лишь как частный случай такого взаимодействия, наблюдающийся при относительно высоких концентрациях антибиотических веществ, которые создаются главным образом в искусственных условиях.

Возможно, что при других количественных отношениях антибиотики, не вызывая смерти и даже не прекращая размножения микробов, могут влиять на некоторые функциональные и даже морфологические свойства их. Подобное влияние может наблюдаться, конечно, и тогда, когда концентрация антибиотиков в среде достаточна для бактерицидного или бактериостатического действия.

Антибиотики, повидимому, играют значительную роль в жизни микроорганизмов. Для понимания этой роли необходимо возможно полнее изучить действие их на различные функции и структуру микробов. Мы провели ряд исследований в этом направлении.

Настоящее сообщение посвящено вопросу о влиянии грамицидина С на морфологию стафилококков и картофельной палочки. Это влияние изучалось двояко.

Во-первых, исследовался вопрос об изменениях морфологии бактерий под действием заведомо бактерицидных доз грамицидина. Во-вторых, изучалась морфология микробов при выращивании их на средах, содержащих суббактериостатические дозы грамицидина, т. е. дозы, лишь частично задерживающие рост микробов или совершенно не задерживающие его.

Первая серия опытов ставилась с тремя культурами стафилококков (2 белые и 1 золотистая) и тремя культурами бацилл из группы B. mesentericus.

Методика состояла в следующем. Суточные агаровые культуры микробов эмульгировались в физиологическом растворе и смешивались с грамицидином с таким расчетом, чтобы в 1 мл эмульсии содержался 1 млрд. микробных тел и 400 гамм грамицидина. В контрольные пробирки грамицидин не добавлялся. Все пробирки помещались в термостат. Периодически из них делались мазки для изучения морфологии находящихся в них микробов.

Наши исследования показали, что как стафилококки, так и картофельная палочка в период гибели под действием грамицидина пре-

терпевают значительные морфологические изменения, заканчивающиеся в большинстве случаев полным распадом клеток.

У стафилококков это выражается в следующем. Прежде всего очень часто теряется связь бактериальных клеток друг с другом, и они начинают располагаться в мазках не группами, а поодиночке.

Затем нарушаются тинкториальные свойства культуры. Через 1½—3 часа окраска становится неравномерной; появляется много бледноокрашенных особей, а в некоторых случаях окраска переходит из грамположительной в грамотрицательную.

В это же время, особенно через 3 часа, начинают обнаруживаться инволюционные формы в виде довольно крупных, но пока еще нормально окрашенных шаров.

Через 3, а чаще через 5 часов количество нормальных кокков значительно уменьшается и начинается распад микробных клеток. В мазках, помимо инволюционных форм, видны в большом количестве бледноокрашенные зерна, шары, пятна неопределенной формы, едва заметные тени и т. п.

В мазках, изготовленных через 24 часа после начала опыта, обнаруживаются почти исключительно продукты распада бактерий. Однако наряду с ними довольно часто встречаются шаровидные инволюционные формы, а также небольшое количество нормальных кокков.

Изменения морфологии клеток у различных культур стафилококков и в различных опытах были не вполне одинаковы. В одних случаях этот процесс имел более, в других менее выраженный характер, но через 24 часа он всегда заканчивался почти полным разрушением культуры.

У B. mesentericus грамицидин вызывал в основном такие же изменения морфологии, как и у стафилококков, но здесь они были выражены несколько более отчетливо. Последнее, повидимому, отчасти объясняется более крупными размерами этих бактерий, облегчающими изучение их строения.

Морфологические изменения у B. mesentericus в большинстве случаев начинались также с изменения окраски. Две из трех культур окрашивались очень слабо уже через 1½ часа после начала опыта. Но одна культура (№ 91) оказалась в этом отношении более устойчивой: она сохраняла нормальную окраску в течение 5 и более часов.

Образование инволюционных форм в виде резко вытянутых бактерий наблюдалось только у культуры № 91. У двух других культур это явление почти во всех опытах отсутствовало или было выражено очень слабо. Зато распад клеток у этих культур начинался, как правило, раньше и протекал интенсивнее, чем у культуры № 91. В данном случае он достигал значительной степени уже через 3—5 часов, в то время как у культуры № 91 в течение 5—6 часов не было заметно никаких признаков нарушения структуры клеток. Однако через 24 часа положение выравнивалось. К этому времени все культуры приходили в состояние распада.

Эмульсии суточных культур B. mesentericus обычно всегда содержали значительное количество споровых форм. Любопытно, что при распаде этих культур споровые формы исчезали так же, как и вегетативные, а может быть, даже несколько быстрее последних. В мазках из культур, находившихся в течение 24 часов под действием грамицидина и состоявших в основном из продуктов распада, нередко обнаруживались в небольшом количестве неспоровые палочки, а палочек со спорами и изолированно лежащих спор мы не находили. Это наблюдение представляет значительный интерес, но ввиду некоторой необычности его нуждается в специальной проверке и изучении.

Итак, грамицидин С в бактерицидных дозах вызывает изменение морфологии бактерий и появление у них в первые часы контакта involюционных форм в виде нитей, шаров и т. п. Последнее обстоятельство указывает на то, что микробы даже в присутствии бактерицидных доз грамицидина могут в течение нескольких часов оставаться живыми, расти и увеличиваться в размерах, хотя может быть уже не размножаясь. Но в конце концов, обычно через 10—20 часов, большинство микробных клеток под влиянием таких концентраций грамицидина все же подвергается распаду.

Этот распад в известной степени напоминает процесс бактериофагии или лизиса микробов под влиянием антител. Как известно, Дюбо и считает его лизисом вторичного характера, вызванным не грамицидином, а аутолизинами. Джонсон, изучавший этот процесс при помощи электронного микроскопа, не говоря ничего о природе процесса, находит у него внешнее сходство с бактериофагией.

Однако необходимо отметить, что при распаде бактерий под действием грамицидина, в отличие от истинного лизиса и бактериофагии, не наблюдается полного растворения бактериальной субстанции, а происходит лишь частичное разрушение клеток, превращение основной массы их в детрит. Мы постоянно обнаруживали значительные количества хорошо видимых продуктов распада и даже совершенно неразрушенные бактерии в эмульсиях, которые после суточного пребывания в термостате хранились в комнате в течение месяца. Повидимому, если распад микробных клеток в данном случае и вызывается аутолизинами, то их действие под влиянием грамицидина приостанавливается преждевременно, и они не доводят процесс до конца.

Влияние суббактериостатических доз грамицидина на морфологию стафилококков и B. mesentericus изучалось следующим образом.

В чашки Петри с МПА, содержащим 0; 6; 12; 25 и 50 гамм грамицидина в 1 мл среды, засевались штрихом испытуемые микробы. Посевы помещались на 2 суток в термостат. Через 24 и 48 часов из всех посевов, которые дали рост, делались мазки для изучения морфологии микробов.

Опыты ставились с 12 культурами стафилококков и 4 культурами B. mesentericus и повторялись несколько раз.

Большинство исследуемых культур давало рост только в тех случаях, когда в 1 мл агара содержалось не более 6 и 12 гамм грамицидина. Лишь 2 культуры стафилококков и 1 культура B. mesentericus почти регулярно вырастали через 48 часов и в присутствии 25 гамм грамицидина в 1 мл среды.

Присутствие в среде грамицидина в количествах, не подавляющих роста микробов, существенно не отражалось на морфологии стафилококков. Даже окраска по Граму в большинстве случаев оставалась у них нормальной и лишь в 20% случаев переходила в отрицательную. Образование involюционных форм наблюдалось редко.

В общем, стафилококки на агаре с грамицидином, если вырастали, то вырастали в морфологическом отношении вполне нормальными или же они совершенно не росли, если концентрация грамицидина была слишком высока для этого.

Иначе обстояло дело у B. mesentericus. Приблизительно в половине случаев культуры этих микробов, выращенные на агаре с грамицидином, теряли нормальную для них грамположительную окраску и красились грамотрицательно. Уже через сутки в посевах B. mesentericus отмечалось появление значительного количества involюционных форм в виде нитевидных, вздутых и частью распавшихся на зерна палочек. Обычно это явление было более выражено при наличии в 1 мл среды 12 гамм грамицидина и слабее при 6 гаммах.

Спорообразование заметно усиливалось в культурах, выращенных на агаре, содержавшем 6 гамм грамицидина в 1 мл, по сравнению с культурами на обычном агаре. Но при более высоких концентрациях грамицидина спорообразование, наоборот, задерживалось.

Таким образом, совершенно ясно, что B. mesentericus реагирует на суббактериостатические дозы грамицидина сильнее, чем стафилококк. Хотя при макроскопическом исследовании посевов рост и размножение B. mesentericus на агаре с грамицидином не обнаруживают заметных уклонений от нормы, однако развитие большинства клеток в культуре принимает явно патологический характер. Это говорит о том, что нормальный рост и развитие клеток у данного микроба нарушаются под влиянием грамицидина раньше, чем способность к размножению.

## Выводы

1. При изучении антибиотиков необходимо исследовать не только бактерицидные и бактериостатические свойства их, но также и влияние их на различные функции и морфологию микробов.

2. В настоящей работе изучалось влияние бактерицидных и суббактериостатических доз грамицидина на морфологию стафилококков и B. mesentericus.

3. Стафилококки и B. mesentericus под действием бактерицидных доз грамицидина С в абсолютном большинстве случаев разрушаются в течение нескольких часов. Однако полного растворения бактериальной субстанции при этом не происходит.

4. При выращивании указанных бактерий на агаре в присутствии суббактериостатических доз грамицидина в культурах B. mesentericus образуются многочисленные инволюционные формы, а стафилококки в этих условиях не дают существенных изменений своей морфологии.

Свердловский институт микробиологии
и эпидемиологии и кафедра микробиологии
Свердловского Медицинского института

*Получено 28.II.1948*

# ДЕЙСТВИЕ ИОНОВ МАГНИЯ И АКРИДИНОВЫХ ПРЕПАРАТОВ НА НАКОПЛЕНИЕ ВИРУСНОГО БЕЛКА МОЗАИЧНОЙ БОЛЕЗНИ ТАБАКА

*В. Л. Рыжков* и *В. А. Смирнова*

В предыдущей работе мы сообщали о том, что некротическая реакция на проникновение вируса мозаичной болезни табака может быть подавлена путем погружения листочков этого табака в децимолярный раствор сернокислого магния [2]. Оставалось, однако, невыясненным, подавляется ли только некротическая реакция или также саморепродукция вирусного белка. Для решения этого вопроса были предприняты описанные ниже опыты.

Листья Nicotiana glutinosa осторожно натирались соком табака, больного мозаичной болезнью, после чего этот сок тщательно смывался и инокулированные листья разрезались на половинки вдоль средней жилки. Одни половинки клались на поверхность децимолярного раствора сернокислого магния, а другие — на поверхность воды. При этом ставились два варианта опыта. В одном варианте листья помещались в жидкость своей верхней стороной вниз так, что точки инокуляции оказывались погруженными, а в другом варианте они помещались в жидкость своей морфологически нижней стороной, и поверхность, на которую был нанесен вирулентный материал, не смачивалась жидкостью или смачивалась ею в слабой степени. Через 7 дней контрольные и опытные половинки растирались, из них извлекался сок, и в этом соке определялся титр вируса, выраженный в табл. 1 средним числом некрозов на лист. N. glutinosa.

Таблица 1

**Влияние магния на накопление вируса мозаичной болезни табака**

| Характер опыта (сторона, которой погружен лист) | Среднее число некрозов | | Число повторностей |
|---|---|---|---|
| | магний | вода | |
| Верхняя . . . . . | 6,4 | 12,4 | 13 |
| » . . . . . | 1,0 | 22,6 | 20 |
| Нижняя . . . . . | 34,0 | 43,0 | 19 |
| » . . . . . | 40,0 | 36,0 | 28 |

Из этой таблицы видно, что в тех случаях, когда раствор соли магния непосредственно соприкасается с точками инокуляции вируса, это резко снижает его накопление. Если такое соприкосновение не имеет места, то снижение титра вируса не наблюдается.

В другом опыте молодые экземпляры помидора были заражены в семядоли вирусом мозаичной болезни табака, причем у половины растений эти семядоли были погружены в пробирки с водой, а у половины с децимолярным раствором сернокислого магния. Опыт был заложен 7/VI, и к 12/VI начало наблюдаться отмирание семядолей, которое шло особенно интенсивно в растворе сернокислого магния, вслед-

ствие чего все семядоли, как погруженные в раствор, так и погруженные в воду, были отрезаны. Учет результатов опыта был произведен 2/VII, причем каждое растение было индивидуально проверено на наличие в нем вируса при помощи реакции на листе N. glutinosa. Из 16 растений, семядоли которых были погружены в раствор сернокислого магния, ни одно ни явным ни скрытым образом не заболело мозаичной болезнью, тогда как из того же количества контрольных растений с семядолями, погруженными в воду, заболело девять.

Этот опыт показывает, что если ионы магния действуют непосредственно в точке инокуляции, то они могут предохранить помидор от мозаичного заболевания.

Дальнейшими опытами было установлено, что подавляющий репродукцию вируса эффект ионов магния имеет место при концентрации сернокислого магния не ниже $^1/_{20}$ моля. При дальнейшем разведении раствора этот эффект ослабляется и затем утрачивается вовсе.

Изучение действия акридиновых препаратов было продолжено в связи с особым интересом, который они приобрели в последнее время. Оказалось, что акридиновые препараты, способность которых подавлять вирус мозаичной болезни табака была установлена Рыжковым, Смирновой и Городской [1], могут также подавлять бактериальные вирусы (Рыжков и Семич [3]).

Ранее мы работали с риванолом, теперь было найдено, что в тех же условиях, как и с риванолом, накопление вируса мозаичной болезни табака может подавляться трипофлавином. Риванол подавляет некротическую реакцию не ниже, чем в концентрации 0,01%. Трипофлавин обладает выраженным эффектом в концентрации, в 10 раз меньшей (0,001%). Для подавления саморепродукции вируса, как видно из нижеследующего, необходимы более высокие концентрации.

Половинки листа N. glutinosa были инфильтрированы 0,05% раствором трипофлавина, а контрольные — водой, после чего через 7 суток был определен в них титр вируса. Сок половинок, инфильтрированных трипофлавином, дал в среднем 4,7 некроза на половинку листа, тогда как сок контрольных листьев дал 33,4 некроза на половинку листа при числе повторностей, равном 39. Двукратная инфильтрация 0,005% раствором трипофлавина лишь значительно меньше отразилась на титре вируса при той же постановке опытов. В среднем на 30 повторностей сок листьев, инфильтрированных водой, дал 98 некрозов, а листьев, инфильтрированных трипофлавином, 49 некрозов.

Опыты, аналогичные описанным выше экспериментам по предохранению помидора при помощи солей магния от заражения мозаичной болезнью, были поставлены также с риванолом. Молодые помидорные растения были в семядоле инокулированы вирусной болезнью табака 20/V, и тотчас семядоли одних растений были погружены в пробирки с 0,01% риванола, а семядоли других — соответственно в пробирки с водой. Семядоли в этом опыте как в воде, так и в растворе риванола были удалены через 8 дней после его начала. К 12/VI из 31 контрольного растения 28 оказались явно больными и только 4 внешне здоровыми, тогда как из 28 растений с погруженными в риванол семядолями только одно оказалось больным.

Уже из прежних наших работ известно, что риванол не инактивирует вируса мозаичной болезни табака в пробирке. Нами было обнаружено, однако, что риванол и трипофлавин обладают способностью образовывать с вирусным белком желтый осадок, причем в этот осадок полностью переходит вирус, сохраняя способность заражать растения, как это видно из табл. 2.

Таким образом, осажденный акридиновыми дериватами вирус сохраняет свою активность, что указывает на известную растворимость полученного препарата. В специальном опыте было установлено, что

Таблица 2

**Осаждение вируса мозаичной болезни табака акридиновыми препаратами**

| Характер опыта | Среднее число некрозов | | Число повторностей |
|---|---|---|---|
| | жидкость над осадком | осадок | |
| Очищенный вирусный белок + риванол . . . | 0,0 | 11,7 | 10 |
| » » » + триптофан . . | 0,0 | 17,0 | 10 |
| Сок мозаичного табака + риванол . . . . . | 4,0 | 120,0 | 10 |

осажденный риванолом вирус не утрачивает активности после высушивания. Представлялось интересным выяснить, в какой степени ослабляется активность вируса при связывании его акридиновыми препаратами, а также, может ли эта связь быть нарушена при помощи диализа. Оказалось, что, если осадок акридинового производного вирусного белка подвергнуть диализу, то вирусный белок переходит в раствор и риванол удаляется путем диализа. Это показывает, что связь, в которую вступает вирус с риванолом, непрочная, по всей вероятности солевая. Вирусный белок может быть осажден при помощи риванола из сока табака, больного мозаичной болезнью. При этом он осаждается свободным от пигментов, что очень трудно достигнуть другими путями, поэтому в некоторых случаях «акридиновый метод» может быть использован для очистки вирусного белка.

В специальном опыте мы сравнили титр вируса в исходном соке с его титром в осадке, а также титром после диализа. Если принять за единицу титр вируса в исходном соке, то мы найдем следующие отношения в опытах с осаждением этого вируса риванолом: жидкость над осадком — 0,006; осадок — 0,17; диализованный осадок — 0,86.

Приведенные данные показывают, что риванол почти полностью извлекает вирус, причем активность вируса в осадке резко понижена, что зависит, очевидно, от того, что активность сохраняет лишь отдельные молекулы, переходящие в раствор. После диализа, который приводит к освобождению вирусного белка от связи его с риванолом и к его растворению, можно говорить о почти полном восстановлении его активности. Временная связь вируса с риванолом не влияет на его вирулентность.

Приведенные опыты имеют и методическое значение. Они показывают, что инактивация вируса и последующая его реактивация иногда могут быть результатом простого перехода вируса в осадок с последующим его растворением.

Возникает вопрос: объясняется ли найденное ранее подавление акридиновыми препаратами саморепродукции вируса описанным здесь действием их на вирусный белок. Мы видели, что связь акридиновых препаратов с вирусным белком очень непрочная и вирусный белок не утрачивает под влиянием этих препаратов своей биологической активности. Это не позволяет рассматривать осаждающее вирус действие акридинов как единственную причину их подавляющего эффекта. Следует отметить, что акридиновые препараты осаждают не только вирусный белок, но также другие белковые вещества и нуклеиновые кислоты, не говоря уже о разных соединениях, встречающихся в протоплазме.

## Выводы

1. Растворы сернокислого магния в концентрации 0,1 моля подавляют саморепродукцию вирусного белка мозаичной болезни табака при условии, что инокулированная поверхность листа погружена в этот раствор.

2. Погружение инокулированной вирусом семядоли помидора в 0,1-молярный раствор сернокислого магния или 0,01% раствор риванола предохраняет это растение от заражения мозаичной болезнью.

3. Некротическую реакцию Nicotiana glutinosa на вирус мозаичной болезни табака подавляет 0,001% трипофлавина. Инфильтрация листьев табака 0,05% трипофлавина резко снижает репродукцию вирусного белка в этих листьях.

4. Риванол и трипофлавин осаждают белок вируса мозаичной болезни табака из раствора. Этот осадок остается инфекционным, после диализа освобождается от риванола и переходит в раствор.

Институт микробиологии
Академии Наук СССР
Москва

*Получено 13.1.1948*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Рыжков В. Л., Смирнова В. А. и Городская О. С. О механизме подавления саморепродукции вируса табачной мозаики тиамином. Биохимия, т. 11, № 3, 1946.
2. Рыжков В. Л. и Смирнова В. А. Влияние электролитов и анаэробных условий на некротическую реакцию у N. glutinosa. ДАН СССР, т. LX, № 3, 1947.
3. Рыжков В. Л. и Семич А. И. О подавлении бактериальных вирусов (бактериофага) некоторыми веществами. Бюлл. эксп. биол. и мед., т. 24, № 10, вып. 4, 1947.

# РАСТВОРЕННЫЕ ОРГАНИЧЕСКИЕ ВЕЩЕСТВА В ОТКРЫТЫХ ВОДОЕМАХ

(Обзор)

*С. В. Горюнова*

В истории науки не раз бывали случаи, когда отдельные наблюдения, посвященные разрешению частного вопроса, коренным образом меняли все ранее установившиеся взгляды на сущность изучаемого явления и порождали ряд новых мыслей и исследований, привлекая специалистов смежных дисциплин.

То же произошло и при возникновении проблемы происхождения растворенного органического вещества в морской воде.

Занимаясь разрешением вопроса об источниках питания планктонных животных, датский ученый физиолог Pütter (1907, 1908, 1909) столкнулся с очень интересным фактом. Подсчитывая расход органического вещества водными организмами по потреблению ими кислорода, он получил цифры, согласно которым планктоноядные животные для получения необходимого количества пищи в виде планктона должны пропускать через себя такое количество воды, которое в десятки тысяч раз превышает их собственный объем. На основании этих материалов автор пришел к выводу о вероятности существования у планктоноядных животных осмотической формы питания и о наличии в окружающей среде питательных веществ.

Действительно, проведенные им анализы обнаружили в морской воде большие количества органических веществ. На вопрос о происхождении этих веществ Pütter отвечал, что они являются продуктами метаболизма водорослей и выделяются в окружающую среду в огромных размерах.

Так, проводя учет выделения кислорода фитопланктоном Кильской бухты и пересчитывая эти цифры на количество ассимилятов, он утверждал (1926), что ассимилятов образуется такое количество, которое не может быть в организмах в виде запасных веществ, так как количество резервных веществ в клетках может равняться только их собственному сухому весу. Исходя из этих пересчетов, он пришел к выводу, что только $^1/_{24}$ или $^1/_{30}$ часть ассимилятов остается внутри клетки, все остальное выделяется в окружающую среду. Сам автор объяснял это явление тем, что в светлые часы суток клетки водорослей, согласно его наблюдениям, не размножаются, а стало быть, не могут и использовать избыточный материал фотосинтеза для построения новых клеток, точно так же, как и отложить его в запас.

Аналогичные результаты автор получил (1924) и при определении выделяемой водорослями углекислоты. Оригинальность исследований Pütter и смелость его выводов были встречены, однако, научными кругами с большим недоверием и вызвали разностороннюю критику.

Особенно недоверчиво воспринималась учеными последняя часть его гипотезы, в которой он предоставляет ассимилирующим клеткам водорослей ведущую роль в обогащении водоемов растворенными органическими веществами.

Несовершенство методики аналитических исследований Pütter, по которой морская вода могла действительно содержать значительно

преувеличенное количество растворенного органического вещества, вызвала ожесточенные нападки Raben (1910). Но после проведения исследований воды из Кильской бухты на содержание органического углерода (10,9—13,9 мл на 1 л) и воды Балтийского моря (3,0—3,2 мл на 1 л) автор вынужден был признать, что количества эти достойны внимания.

Работами Atkins (1922, 1923) также установлено присутствие растворенных органических соединений в морской воде, но количество их в разных водах неодинаково. Так, пользуясь методом окисляемости, автор получил цифровой материал, приведенный в табл. 1.

Таблица 1

| Водоемы | Нефильтрованная вода | | Вода, отфильтрованная от детрита и планктона | |
|---|---|---|---|---|
| | Окисляемость в мл $O_2$ на литр перманганат | | | |
| | кислый | щелочный | кислый | щелочный |
| Эстуарий (Burnham on grouch) . . . . . | 1,00 | 1,28 | 0,80 | 1,10 |
| Устье реки (Ipswich) . . . . . | 0,98 | 1,15 | 0,76 | 0,96 |
| Побережье Эссекса (West Mersea) . . . . . | 0,92 | 1,05 | 0,73 | 0,92 |
| Побережье Кента (Whitstable) . . . . . | 0,74 | 0,85 | 0,55 | 0,64 |

В дальнейшем гипотеза Pütter «о наличии растворенных веществ в морской воде» была подтверждена работами целого ряда его последователей. Например, Gaarder и Gran (1927), проводя наблюдения над динамикой фитопланктона, обнаружили, что увеличение числа клеток водорослей обычно влечет за собой и увеличение бесхлорофиллоносных организмов, которые питаются бактериями и осмотически-растворенными в воде питательными веществами.

Исследование Gran и Ruud (1926) по изучению «окисляемости» воды Осло-фиорда в течение целого года показало, что максимальная «окисляемость» летних месяцев и минимальная зимних не пропорциональны содержанию планктона. По их определениям, количество растворенного органического вещества значительно превышало количество органического вещества, заключенного в живых организмах (1 : 12,7 и 1 : 2,7).

Однако вследствие общей методической ошибки, допущенной всеми вышецитированными авторами, а именно: игнорирование бактериальной массы, присутствующей при проведении этих экспериментальных исследований, и установление соотношения между растворенной частью органических веществ и находящихся во взвешенном состоянии,— решение поставленной задачи не могло считаться окончательно завершенным.

Вполне естественно поэтому, что следующий этап развития этой проблемы носит совершенно иной характер, чем прежние экспериментальные работы. Не прекращая накопления фактического материала по непосредственному определению суммарного количества органических веществ как в открытых, так и пресных водоемах, исследователи глубже начинают заниматься вопросами, посвященными разработке новых методов, специально приспособленных для анализов водных образцов. Дело в том, что все попытки определения органических веществ, находящихся действительно в растворе, наталкиваются на целый ряд серьезнейших затруднений. Экспериментированию мешает чрезвычайно

высокая соленость морской воды, связанная с присутствием больших количеств минеральных солей наряду с небольшими дозами растворенных органических соединений [Krogh (1935); 10 000 : 1]. Сильно усложняет работу и очистка анализируемых проб воды от бактериального населения.

Основные исследования по разработке новых количественных методов определения растворенных органических веществ в морской воде принадлежат Krogh и его школе (1929a, 1930, 1930a, 1930b, 1930c, 1934a, 1934b, 1934c).

Разработанные им методы имеют большое значение не только потому, что они очень точны, но также и потому, что они проводились с образцами воды, впервые полностью освобожденной от бактериальной флоры при помощи мембранных фильтров «Gesellschaft Göttingen» (100 см³ за 70 сек. при одной атмосфере и поверхности фильтра, равной 100 см²).

Непосредственные анализы, проведенные Krogh по определению органических веществ в водах Атлантического океана, дали оригинальный материал (табл. 2).

Таблица 2

| Станция | Глубина в м | Общий азот в мг | Аммиачный азот в мг | Азот в органич. соединениях в мг |
|---|---|---|---|---|
| Атлантический океан 30° сев. широты, 69° зап. долготы | Поверхность | 0,378 | 0,120 | 0,258 |
| | 25 | — | 0 036 | — |
| | 1 000 | 0,175 | 0,027 | 0,248 |
| | 2 000 | 0,265 | 0,025 | 0,240 |
| | 3 250 | 0,249 | 0,021 | 0,229 |
| | 3 750 | — | 0,024 | — |
| | 4 250 | 0,273 | — | 0,250 |
| | 4 750 | 0,261 | 0,023 | 0,238 |

Цифры показывают, что все слои воды Атлантического океана, от поверхности до дна, содержат примерно одинаковое количество органически связанного азота, составляющего в среднем 0,244 г на 1 м³.

Аналогичная картина наблюдалась и при определениях органического углерода. Количество его в среднем достигает 2,36 г на 1 м³, что соответствует приблизительно 5 г органического вещества.

В 1936 г. Скопинцевым (1938) определялись количества органических веществ, растворенных в воде и пене Каспийского моря. Для отделения взвешенных примесей (детрит, планктон, микроорганизмы) он употреблял газ № 25, мембранные фильтры и обработку воды сернокислым алюминием [$Al_2(SO_4)_3$]. Опыты показали, что «окисляемость» воды после первого приема разделения (газ № 25) составляет 90% от исходного определения нефильтрованной воды, после второго (мембранные фильтры) 85% и после третьего [осаждение $Al_2(SO_4)_3$] 76—83%.

Определения величины окисляемости по отдельным горизонтам в открытом море указывают на уменьшение ее с глубиной, причем наибольшее снижение наблюдается между 25 и 50 м, т. е. ниже границы фотосинтетического слоя. Придонные пробы воды имеют опять повышенную окисляемость. Последнее обстоятельство Скопинцев объясняет накоплением органического вещества на дне.

Сравнивая полученные результаты с прежними исследованиями воды Баренцова моря (станция на стрежне Нордкапской струи Гольфстрима, экспедиционное судно «Персей», 1932), автор отмечает, что содержание органического вещества в водах Каспия (0—25 м глубины: 2,4—2,5 мг/л; 50—300 м глубины: 1,8—1,9 мг/л) значительно превышает таковое для Баренцова моря (0—25 м глубины: 0,42 мл; 50—300 м глу-

бины: 0,14 мл). Безусловно, здесь сказываются мощность речного стока и полная замкнутость Каспийского моря.

Анализы пены Красноводского и Карабугазского заливов дали очень сильное снижение окисляемости при обработке проб сернокислым алюминием, что указывает на своеобразие ее органического состава.

Дацко (1939) в своих опытах несколько видоизменил методику Krogh и Keys (1934a) при определении органического углерода, заменив осаждение хлоридов сульфатом таллия — сульфатом серебра. Пробы им консервировались сулемой без фильтрации. Азот он определял колориметрическим методом (реакция Несслера) в натуральной морской воде. Точность его определений для углерода ±0,2 мг/л и для азота ±0,02 мг/л (табл. 3).

Таблица 3

| Водоем | Положение станции | Дата | Глубина водоема в м | Горизонт | Углерод в мг/л | Азот в мг/л |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Гренландское море | 48°58′ N<br>03°40′ E | 9.IX<br>1933 | 1 000 | 25<br>750 | 2,1<br>2,0 | 0,21<br>0,23 |
| Белое море | 65°52′ N<br>37°02′ E | 19.IV<br>1934 | 120 | 35<br>50<br>100 | 2,5<br>—<br>2,6 | —<br>0,30<br>0,32 |
| Черное море | 44°16′ N<br>36°30′ E | 26.IX<br>1937 | Около<br>1 500 | 25<br>300 | 1,4<br>2,3 | 0,22<br>0,27 |
| Азовское море | 46°03′ N<br>36°45′ E | 24.IX<br>1937 | 11—8,8 | 0<br>10<br>0 | 3,0<br>3,2<br>3,7 | 0,61<br>0,58<br>0,62 |
| Южный Каспий | 39°00′ N<br>50°42′ E | 19.II<br>1934 | 948 | 25<br>400 | 5,9<br>5,2 | 0,45<br>0,48 |
| Средний Каспий | 42°07′ N<br>48°56′ E | 7.IX<br>1936 | 586 | 940<br>400 | 5,6<br>5,6 | 0,50<br>0,48 |

Вполне естественно, что вопрос о присутствии растворенных органических веществ в открытых водоемах нашел отклик также и в работах лимнологов. Так, по данным Juday (1942), «урожай» растворенной органической материи с гектара поверхности озер штата Висконсиния составляет в год примерно следующую сумму в килограммах:

| Водоем | Озеро Mendota | Озеро Green | Озеро Neblish | Озеро Weber |
|---|---|---|---|---|
| Растворенная органическая материя | 15.201 | 27,901 | 3,829 | 2,866 |

Работами Domogalla, Juday и Peterson (1925), Peterson, Fred и Domogalla (1925) установлено, что в воде озера Mendota содержание общего органического азота в растворе достигает 400 мг на 1 м³, причем в состав этого азота входят даже аминокислоты. Так, было найдено, что триптофана, тирозина и гистидина содержится в воде до 13 мг на 1 м³, а цистина до 4 мг.

Вот пока и весь тот фактический материал, которым мы располагаем по учету общего количества растворенных органических соединений в водах различных водоемов.

Несмотря на его ограниченность, мы все же можем признать, что в настоящее время факт наличия растворенных органических веществ в водах открытых и пресных водоемов в общих чертах может считаться окончательно установленным.

Но отсюда как следствие вытекает второй вопрос — вопрос об источниках происхождения этих веществ.

Pütter (1924, 1926) в свое время дважды доказывал возможность выделения огромных количеств продуктов ассимиляции живыми клетками водорослей, но не встретил поддержки. Несовершенство применявшейся им методики и величина цифровых значений у многих вызывали большое сомнение, хотя, казалось бы, что о возможности выделения клетками водорослей органических веществ в окружающую среду говорят факты их симбиотического сожительства с другими представителями животного и растительного мира. Pringsheim (1926), например, пишет: «я знаю, что уже давно установлено, как многие микроорганизмы, такие, как дрожжи, обогащают культуральную жидкость органическими веществами. Почему не могут делать этого водоросли?» Приводя опыты с симбионтами Paramaecium bursaria и Zoochlorella в растворе, свободном от органических веществ, он подтверждает, что Paramaecium может при полном отсутствии обычного питания на свету использовать продукты ассимиляции Zoochlorella.

Benecke (1924) на основании своих исследований по изучению симбиоза водорослей с грибами приходит к той же мысли и уверен, что в процессе ассимиляции живые водоросли обогащают среду органическими веществами неизвестной природы.

Особенный интерес в этом отношении вызывают лишайники, так как они не представляют даже самостоятельной по своему происхождению группы низших растений, а образованы соединением гриба, водоросли и азотобактера [Генкель, 1936, 1938].

Однако, несмотря на то, что все эти предположения имеют под собой определенные основания, сам факт выделения органических веществ живыми клетками водорослей мог считаться только вероятным, но не доказанным прямыми опытными исследованиями.

Для решения его возникла необходимость в перенесении аналитической части работы из природных условий в лабораторные, создающие более строгую экспериментальную обстановку и позволяющие работать в стерильных условиях с чистыми культурами.

И вот в 1930 г. по этому вопросу были опубликованы сразу три аналогичные работы: Roberg, Krogh и Никитинского.

В качестве объектов Никитинским (1930) были выбраны две водоросли: Stigeoclonium tenue и Rhaphydium polymorphum. Методика постановки опытов была такова: безбактериальные, альгологически чистые культуры при сохранении стерильных условий выращивались на минеральной среде. Перед заражением в питательном растворе определялась окисляемость по Кубелю. После заражения пробы брались периодически. Результаты везде были положительными — окисляемость возрастала с увеличением урожая водорослей и продолжительностью опыта. В отдельных случаях она доходила до 350 мг/л. Качественные реакции дали положительный ответ на белки при Stigeoclonium tenue и на редуцирующие сахара в случае Rhaphydium polimorphum.

Что же касается объяснения самого механизма этого явления, то Никитинский склонен считать, что присутствие в среде окисляемых веществ носит патологический характер и не связано с выделениями живых клеток.

Ученик и сторонник взглядов Никитинского, Алеев (1933, 1934, 1936, 1938), значительно увеличил количество опытных объектов и провел исследования с целым рядом водорослей (Ankistrodesmus, Kirchneriella, Chlorella, Pediastrum, Stichococcus), сохраняя те же условия и методику опытов.

Оказалось, что различные виды водорослей с различной интенсивностью обогащают среду растворенными органическими веществами. На первом месте была Kirchneriella lunaris M. Считая неправильным объяснения данного факта с позиций Pütter, автор приписывает это просто способности вышеназванной водоросли выделять в окружающую среду огромные количества слизи.

Качественные реакции на редуцирующие сахара дали положительные результаты только в случае Kirchneriella. В фильтратах других культур отчетливо получалась биуретова проба.

Но, несмотря на полученные результаты, автор, так же как и Никитинский, склонен думать, что накопление органических веществ в среде связано только с автолизом. Для подтверждения этих соображений он поставил ряд дополнительных исследований и установил, что процесс автолиза для водорослей возможен.

Экспериментальные исследования Krogh и Lange (1930c) делятся на две группы. Первая серия опытов была посвящена исследованиям с чистой культурой Scenedesmus obliquus, полученной ими от Chodat из Женевы, во второй они использовали для опытов натуральную воду из пресного озера Furesö в момент его цветения.

Анализы проводились по методу сухого сжигания, специально разработанному авторами (1930a, 1930b) для работы с образцами пресной воды.

Полученные результаты сведены нами в таблицах 4 и 5.

Таблица 4

**Определение $CO_2$, $O_2$ и $N_2$ и фильтрате в массе водорослей чистой культуры**

| Образцы | Объем фильтрата в см³ | Вес сухих водорослей в мг | $CO_2$ в см³ | $O_2$ в см³ | $N_2$ в см³ | $\frac{CO_2}{O_2}$ |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Опыт I — фильтрат . . . . | 500 | 80 | 5,08 | 4,45 | 0,46 | — |
| » II » . . . . | 500 | 50—60 | 2,58 | 3,26 | 0,16 | 0,8 |
| » II » . . . . | 500 | 48 | 1,35 | 1,67 | 0,10 | 0,81 |
| Фильтрат после фильтрации через мембранный фильтр | 500 | 48 | 2,25 | 2,42 | 0,38 | 0,93 |
| Сухие водоросли . . . . . | — | 10 | 6,48 | 8,18 | 0,53 | 0,79 |
| Фильтрат, выдержанный без водорослей . . . . . | 500 | — | 1,17 | 0,7 | 0,17 | — |

Таблица 5

**Определение $CO_2$, $O_2$ и $N_2$ в пробах из озера Furesö после выдерживания их в водяной ванне при 23° на рассеянном свету в течение 44 дней**

| Образцы | $CO_2$ в см³ | $O_2$ в см³ | $N_2$ в см³ |
|---|---|---|---|
| Пробы, предварительно отфильтрованные через бумажный фильтр . . . . . | 11,40 | 12,03 | 0,53 |
| Пробы не фильтрованной воды . . . . . | 9,95 | 10,59 | 0,40 |
| Контроль — натуральная воды определялась тотчас же по взятии пробы . . . . . | 8,41 | 8,53 | 0,50 |

Принимая, что процент золы в клетках составляет около 38—39, получаем, что водоросли в экспериментальных условиях выделяют в окружающую среду всего лишь 5—10% созданного ими органического материала. Цифра эта настолько незначительна, по мнению автора, что не дает даже повода к мысли о возможности выделения растущими клетками водорослей продуктов ассимиляции в окружающую среду и получается только за счет отмерших организмов.

Roberg (1930) проводил свои исследования с безбактериальными, альгологически чистыми культурами Chlorella vulgaris, Scenedesmus bijugatus и Coccomyxa simplex, полученными от Прингсхейма из Праги.

Основным критерием для решения поставленной задачи автор избрал метод соотношения между количеством углерода, накопленного самой массой водорослей, и количеством его в фильтрате культуры. Определения проводились по Messinger, т. е. сожжением связанного органического углерода и определением угольной кислоты.

Цифровой материал, полученный автором, сведен нами в общей таблице 6.

Таблица 6

| | Название водоросли | Наименование испытуемого материала | Количество углерода в мг через | | | Соотношение углерода по срокам | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 4 недели | 10 недель | 12 недель | 4 недели | 10 недель | 12 недель |
| I опыт | Chlorella vulgaris | Масса водорослей | 12,05 | 18,5 | — | 1:19 | 1:7 | — |
| | | Фильтрат | 0,62 | 2,67 | — | | | |
| | Scenedesmus bijugatus | Масса водорослей | 7,55 | — | 11,95 | 1:25 | — | 1:19 |
| | | Фильтрат | 0,30 | — | 0,63 | | | |
| | Coccomyxa simplex | Масса водорослей | 5,15 | 8,05 | — | 1:12 | 1:9 | — |
| | | Фильтрат | 0,44 | 0,88 | — | | | |
| II опыт | Chlorella vulgaris | Масса водорослей | 3,5 | — | 12,7 | 1:9 | — | 1:8 |
| | | Фильтрат | 0,4 | — | 1,55 | | | |
| | Scenedesmus bijugatus | Масса водорослей | 3,0 | — | 6,8 | 1:13 | — | 1:9 |
| | | Фильтрат | 0,24 | — | 0,74 | | | |

На основании вышеприведенных данных Roberg должен был признать, что питательный раствор живых, растущих клеток обогащен органическим веществом. По его описаниям, фильтраты культуры водорослей всегда были бесцветны и прозрачны, но обладали большой способностью к пенообразованию при взбалтывании. Однако реакции на белок не дали положительных результатов. Коагуляции при нагревании этих растворов также не наблюдалось. Реакции на простые сахара оказались отрицательными. Микроскопические наблюдения автора над ростом и отмиранием клеток водорослей в процессе развития показали, что процент мертвых клеток в культурах, даже 12-недельных, очень незначителен и не превышает 6, т. е. составляет ничтожную величину.

К таким же результатам приходят Braarud и F∅yn (1938), работавшие с Chlamydomonas и проводившие определения органических веществ методом окисления по Аткинсу. Они подсчитали, что за 45 суток водоросли выделили в среду такое количество органических веществ,

которое требует на свое окисление 0,45 мг кислорода, в то же время в самих водорослях накопилось органических веществ, требующих на окисление 0,95 мг $O_2$.

Barker (1938) опубликовал работу, посвященную фотосинтезу у диатомей, в которой он определил количество ассимилятов, накопленных в минеральной среде Nitzchia palea в течение 5 часов сильного освещения. Параллельно было определено и количество ассимилированной водорослями углекислоты. Оказалось, что из 3,5 мг органических веществ, синтезированных водорослями во время опыта, было выделено в окружающую среду 0,5 миллиграмма.

Подводя итог второй части поставленной проблемы — об источниках обогащения водоемов растворенными органическими веществами — и критически просматривая все вышецитированные работы, мы должны объяснить противоречивые суждения отдельных исследователей только большой сложностью изучаемого явления и несовершенством применявшихся при этом экспериментальных методов определения.

По существу, кроме Roberg и Krogh, никто даже не проводил непосредственных определений этих веществ. Как правило, авторы для этой цели пользовались побочными определениями и получали цифры растворенных органических веществ по пересчетам, например, по выделению $CO_2$, по поглощению кислорода, по окислению перманганатом и т. д. Насколько относительны эти методы, мы можем судить хотя бы по работам Garter, который проверял перманганатный метод окисления и показал пределы его точности. Так, в зависимости от продолжительности кипячения пробы, можно получить следующее количество органических веществ в процентах от общего содержания их в растворе (табл. 7).

Таблица 7

| Наименование вещества | Кипячение | |
|---|---|---|
| | 5 минут | 10 минут |
| Винная кислота | 76,05 | 5,58 |
| Глюкоза | 42,75 | 61,02 |
| Сахароза | 53,83 | 55,18 |
| Фенол | 41,13 | 73,5 |
| Бензойная кислота | 19,00 | 3,74 |
| Лейцин | 10,8 | 11,2 |

Отсюда вполне понятно, что метод окисляемости, легкий и быстрый по выполнению, очень удобен для всяких ориентировочных и поисковых работ, но не годится в тех случаях, когда в растворе имеются только следы органических веществ (10—12 мг на 1 л раствора или 0,5—0,6 мг в 50 $см^3$).

Есть в этих работах неясности и другого порядка. Например, Никитинский (1930), проводя свои исследования с Rhaphydium polymorphum, выращивал водоросли в непроточной культуре 620 дней (почти 2 года). Этого срока, конечно, вполне достаточно, чтобы культивируемая водоросль, несмотря на то, что она развивается значительно медленнее, чем грибы и бактерии, дала *n* количество генераций, которые смогли бы в достаточной степени истощить питательную среду, отравить ее своими продуктами обмена и привести тем самым культуру к патологическим явлениям — к автолизу.

Способность водорослей к автолизу ни у кого не может вызвать сомнения: всякой живой клетке при определенных условиях присущ этот процесс.

Безусловно, в природных условиях, кроме естественного отмирания, связанного с продолжительностью жизни отдельных индивидуумов, с сезонными колебаниями количества питательных веществ, с температурой воды и длиной дня, существует еще много других причин, способных вызвать растворение организмов.

В настоящее время является совершенно бесспорным, что органические вещества, попадающие в моря с суши, имеют очень небольшое значение по сравнению с тем количеством их, которое образуется в самом океане. Для иллюстрации достаточно привести отдельные выдержки из сводной таблицы Riley (1942), посвященной продуктивности фитопланктона Западной Атлантики, чтобы понять величину мощности фотосинтезирующего процесса планктонных организмов. Так, согласно его исследованиям, отдельные станции наблюдений дали следующее число граммов углерода в год на один квадратный метр:

| | |
|---|---|
| 1. Пролив Лонг-Айленд . . . . . | 600—1000 |
| 2. Западная Атлантика (23—38°) . . . . . | 530 |
| 3. Западная Атлантика (38—40°) . . . . . | 320 |

Естественно поэтому, что часть исследователей при объяснении источников обогащения водоемов органическим веществом приписывает это главным образом процессам автолиза и действию микроорганизмов на посмертные останки [Harwey, 1928, 1929; Sverdrup, 1942; ZoBell 1946; Зернов (1934); Курсанов (1945); Гусева (1938); Книпович (1936) и Воронихин (1945)].

Но для того чтобы правильно познать процесс круговорота веществ в природе целиком, во всей его совокупности, нельзя свести все явления накопления органических веществ в различных водоемах к массовым процессам саморастворения организмов и дальнейшей минерализации их остатков. На самом деле, наверное, этот процесс происходит значительно сложнее. Нельзя забывать о том, что вся масса микроскопических одноклетных, реже колониальных форм водорослей, несмотря на наличие в их клетках хлорофиллоносного аппарата, во многом приближается к микроорганизмам.

Так, они так же, как и низшие грибы и бактерии, соприкасаются всей поверхностью своего тела с внешней окружающей средой и очень реактивны ко всем ее незначительным отклонениям.

Они так же, как и другие микроорганизмы, несмотря на способность отдельных групп к азотфиксации и на обязательное присутствие в их клетках хлорофилла, фикоциана и других пигментов, способны питаться за счет готовых органических веществ среды, т. е. они могут перестраивать и направлять свой внутренний, регулирующий энергетические процессы аппарат по любому из указанных путей, т. е. по типу автотрофно или по типу гетеротрофно питающихся организмов.

Они также, в зависимости от условий, должны выделять в окружающую среду те или иные продукты обмена.

Неверно пренебрегать теми, кажущимися на первый взгляд, ничтожными величинами, получающимися при определениях органического углерода в стерильных фильтратах культуры водорослей, как это делает Krogh (1930c), который произвольно, без специального учета, относит те 5 или 10% выделенных в среду органических веществ за счет отмерших организмов. Работы Roberg (1930) опровергают это. При общих же перерасчетах такое игнорирование малых величин (в малых же пробах) может привести к серьезнейшим ошибкам.

Так, казалось бы, незначительное количество растворенных органических соединений в морской воде, не превышающих в основном 5 г в 1 м$^3$, по подсчетам самого же Крога (1935), дает в вертикальном столбе воды в 5 400 м (средняя глубина Атлантического океана) под 1 м$^2$ поверхности 1,3 кг органического азота и 12,7 кг углерода. А это

по крайней мере в 300, а может быть в 1 000 и более раз превышает количество органического вещества, заключающегося во всех морских организмах.

Не расчленяя этих процессов, не изучая в отдельности продуктов метаболизма и автолиза разных групп водорослей, отличающихся по своему химическому составу от высших растений, мы не сможем узнать не только качественный, но даже и суммарный количественный состав этих веществ и тем самым не сможем довести решение поставленной задачи до конца.

Придавая большое значение накоплению органического вещества живыми микроскопическими формами водорослей, Исаченко поставил в своей лаборатории ряд исследований, посвященных выяснению степени участия в процессах метаболизма мало изученной в этом отношении группы микроорганизмов, а именно водорослей.

## ЛИТЕРАТУРА


1. Алеев Б. С. Выделение водорослями органических веществ в окружающую среду. Тр. Всесоюзного научно-иссл. ин-та водоснабжения. 1933.
2. Алеев Б. С. Выделение водорослями органических веществ в окружающую среду. Микробиология, т. III, вып. 4, 1934.
3. Алеев Б. С. Автолиз у водорослей. Биохимия, т. I, вып. 1, 1936.
4. Алеев Б. С. Диссертация. Библиотека Плехановского ин-та. 1938.
5. Арнольди А. П. Введение в изучение низших организмов. М., 1925.
6. Воронихин Н. Н. Растительный мир океана. М.— Л., 1945.
7. Генкель П. А. и Южакова Л. А. Азотфиксирующие бактерии в лишайниках. Изв. Пермск. биолог. научно-иссл. ин-та, т. X, 1936.
8. Генкель П. А. О лишайниковом симбиозе. Бюлл. Моск. о-ва испыт. природы. Сер. биологич., т. 47, вып. 1, 1938.
9. Гусева К. А. Гидробиологическая производительность и прогнозы цветения водоемов. Микробиология, т. VII, вып. 3, 1938.
10. Дацко П. И. Растворенные органические вещества в морской воде. ДАН СССР, т. XXIV, № 3, 1939.
11. Зернов С. А. Общая гидробиология. М.— Л., 1934.
12. Исаченко Б. Л. Исследования над бактериями Северного Ледовитого океана. Тр. Мурм. научно-иссл. промысловой экспедиции. 1906 г. Моногр. 1914.
13. Исаченко Б. Л. Микробиологические исследования над грязевыми озерами. Тр. Геол. ком. Нов. сер., вып. 143, 1927.
14. Исаченко Б. Л. Хлористые, сульфатные и содовые озера Кулундинской степи и биогенные процессы в них. 13 кн. Кулундинская экспедиция АН СССР, Изд. АН СССР, 1934а.
15. Исаченко Б. Л. Микроскопический анализ грунтов Азовского и Черного морей. Тр. Госуд. гидрол. ин-та, т. 9, 1934б.
16. Исаченко Б. Л. Об очередных задачах микробиологического изучения воды и грунтов морей. Доклады юбилейной сессии Арктическ. научно-иссл. ин-та Главсевморпути, 1945.
17. Книпович Н. Гидробиология. М., 1936.
18. Крог А. Успехи современной биологии, т. IV, вып. 6, 1935.
19. Курсанов Л. И. Низшие растения. М., 1945.
20. Никитинский Я. Я. Stigeoclonium tenue. Тр. водоснабжения, 1930.
21. Скопинцев. Органические вещества воды Каспийского моря. ДАН СССР, т. XVIII, № 7, 1938.
22. Харвей Г. В. Биохимия и физика моря. Изд. АН СССР (перевод), 1933.
23. Atkins W. Respirable organic matter in sea water. J. Mar. Biol. Ass., v. 12, p. 772, 1922; v. 13, p. 113, 1923.
24. Barker H. The culture and physiology of the marine Dinoflagellates. Arch. Microb., v. 6, 153.
25. Benecke W., Benecke J. Pflanzenphysiologie. Jena. 1924.
26. Braarud u. Fon — цит. по Алееву, диссертация 1938 г.
27. Domogalla, Juday and Peterson, J. Biol. Chem., v. 63, p. 269, 1925.
28. Gaarder u. Gran. Conseil perman. intern. par. l'exploration de la mer, v. 42, 1927. Цит. по Харвей, Биохимия и физика моря, 1933.
29. Gran u. Rund. Untersuchungen über die Meerwasser gelösten organischen Stoffe und ihr Verhältnis zur Plankton-Produktion. Avhan. Utg. a. D. Norske V. Akad. i. Oslo. I. Matem.— Naturvid. Klasse No. 6, 1926. Цит. по Харвей, Биохимия и физика моря, 1933.
30. Harvey H. W. Oxidation in sea water. J. Mar. Biol. Ass., v. 13, p. 953. 1925.

31. Harvey H. W. Biological chemistry and physics of sea water. Cambridge Univ. Press, 1928.
32. Juday C. The summer standing crop of plants and animals in four Wisconsin lakes. Trans. Wisconsin Acad. Sci., v. 34, p. 103; 28 ref., 1942.
33. Krogh A. and Rehberg P. B. $CO_2$-Bestimmung in der atmosphärischen Luft durch Mikrotitration. Bioch. Z., Bd. 205, S. 265, 1929.
34. Krogh A. and Rehberg P. B., $CO_2$-Bestimmung in Flüssigkeiten und Geweben durch Mikrotitration. Bioch. Z., Bd. 224, S. 177, 1930.
35. Krogh A. Ueber die Bedeutung von gelösten organischen Substanzen bei der Ernährung von Wassertieren. Verg. Physiol., Bd. 12, S. 668, 1930a.
36. Krogh A. Eine Mikromethode für organische Verbrennunganalyse, besonders von gelösten Substanzen. Bioch. Z., Bd. 221, S. 246, 1930b.
37. Krogh A. and Lange E. On the organic matter given of by algen. Biochem. J., v. 24, p. 1166, 1930c.
38. Krogh A. and Keys A. Methods for determination of Dissolved organic carbon and nitrogen in sea water. Biol. Bull., v. LXVII, p. 132, 1934a.
39. Krogh A., A method for the determination of ammonia in water and air. Biol. Bull., v. LXVII, p. 126, 1934b.
40. Krogh A. Conditions of life in the ocean. Ecol. Monogr., v. 4, p. 421, 430, 1934c.
41. Peterson, Fred and Domogalla. J. Biol. Chem., v. 63, p. 287, 1925.
42. Pringsheim. Archiv f. Protistenkunde, v. 64, p. 1926.
43. Pütter A. Die Ernährung der Wassertiere. Z. allg. Physiol., Bd. 7, S. 283, 1907.
44. Pütter A. Der Stoffaushalt des Meeres. Z. allg. Phisiol., Bd. 7, 1907.
45. Pütter A. Studien zur vergleichenden Physiologie des Stoffwechsels. Abh. Ges. Wiss. Göttingen. N. F., Bd. 7, S. 3, 1908.
46. Pütter A. Die Ernährung der Wassertiere und der Stoffaushalt der Gewässer. Jena, 1909.
47. Pütter A. Der Umfang der Kohlensäurereduktion durch die Planktonalgen Pflügers Archiv, Bd. 205, S. 293, 1924.
48. Pütter A. Atmung und Assimilation im Kanarenstrom. Archiv Hydrob., Bd. 17, S. 597, 1926.
49. Raben E. Ist organischer Kohlenstoff in nennenswerter Menge im Meerwasser gelöst vorhanden? Wiss. Meeresunt. N. F. Bd., 11, S. 111, 1910.
50. Riley G. Plancton Studies III. Long Island Sound. Bull. of the Bingham. Oceanographic. Collection. 1941.
51. Roberg M. Ein Beitrag zur Stoffwechselphysiologie der Grünalgen. Jahrb. wiss. Bot., 72, 369, 1930.
52. Sverdrup, Johnson, Fleming. The ocean. Chopt. VIII. New York Prentice-Hall. INC, 1942.
53. ZoBell. C. Marine Microbiology 1946, Waltham.

# Н. Ф. ГАМАЛЕЯ

В этом году исполняется 65 лет научной деятельности старейшего микробиолога нашей страны, почетного академика Н. Ф. Гамалея.

Деятельность Н. Ф. Гамалея началась в эпоху, знаменательную для биологической науки, в эпоху открытия Пастера, когда закладывался самый фундамент микробиологии, и Н. Ф. Гамалея был одним из первых деятелей этой, в то время еще молодой науки. Заслуги юбиляра перед медицинской микробиологией чрезвычайно велики. Достаточно перечислить те инфекционные болезни, которыми он успешно занимался, чтобы в этом убедиться: бешенство, холера, чума, туберкулез, оспа, паразитарные тифы, инфекционная анемия.

Большое значение работы Н. Ф. Гамалея имеют также для общей микробиологии. Его исследования, посвященные изменчивости микробов под влиянием солей лития и кофеина, так же как и его работы, посвященные процессам разрушения бактерий, можно считать классическими. Существенно отметить, что Н. Ф. Гамалея, наблюдая спонтанный лизис бактерий, был первым ученым, экспериментировавшим с литическим началом и пытавшимся его выделить путем осаждения уксусной кислотой. Эти работы предвосхищают дальнейшие исследования по очистке бактериофага и других фильтрующихся вирусов. Н. Ф. Гамалея принадлежал к тому узкому кругу ученых, которые делали первые и трудные шаги в усовершенствовании прививок против бешенства, сибирской язвы и других вакцин, и он должен быть назван как ближайший соратник Пастера и товарищ Мечникова.

Заслуги Н. Ф. Гамалея перед нашей отечественной теоретической и практической микробиологией огромны. Он организовал в Одессе первую в нашей стране и вторую в мире пастеровскую станцию по вакцинации против бешенства. Он вел энергичную работу по профилактике эпидемий холеры и чумы, по его настояниям впервые было введено всеобщее обязательное оспопрививание.

Обширна и успешна литературная деятельность Н. Ф. Гамалея. Его перу принадлежат многочисленные монографии и учебники, по которым учились поколения русских и иностранных микробиологов.

Неутомимая и плодотворная деятельность почетного академика Н. Ф. Гамалея продолжается и до настоящего времени. Как и 65 лет назад, он продолжает публикацию научных работ, книг, не оставляя также и деятельности популяризатора, которой он всегда, по лучшим традициям русских ученых, уделял достаточно большое внимание.

Пожелаем Н. Ф. Гамалея здоровья, бодрости и новых успехов в науке.

*Редакция*

# РЕФЕРАТЫ

## ОБЩАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ: МОРФОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ

Brockmann M. and Stier T. **Steady state fermentation by yeast in a growth medium.** (Стабильное брожение дрожжей в питательной среде). J. Cell. Comp. Phys., v. 29, No. 1, pp. 1—14, 1947.

Описан разработанный авторами метод получения стабильной неразмножающейся культуры дрожжей. Дрожжи находятся в оссбом аппарате в токе $CO_2$ при почти полном отсутствии кислорода. Такие культуры в течение длительного времени, до 200 часов, могут, совершенно не размножаясь, сбраживать сахар с постоянной скоростью 0,18—0,25 г глюкозы в 1 час на $10^{10}$ клеток. Среда является полноценной, и при аэрации на ней вырастает до 300 млн. клеток на 1 мл.

*И. Работнова*

Brockmann M. and Stier T. **Cellular mechanism controlling rate of glucose consumption by yeasts.** (Клеточный механизм, регулирующий скорость потребления глюкозы дрожжами). J. Cell. Comp. Phys., v. 29, No. 2, pp. 159—178, 1947.

При работе со стабильными культурами авторы пришли к выводу, что в живых дрожжах скорость потребления глюкозы зависит от скорости, с которой тратятся богатые энергией фосфорные связи. В быстро размножающейся культуре эти фосфорные связи тратятся на синтез клеточного вещества. Поэтому скорость потребления глюкозы на 1 клетку в период активного размножения выше, чем в стабильной неразмножавшейся культуре. В стабильной культуре фосфатные связи накапливаются и тормозят потребление глюкозы. Потребление сахара в неразмножающихся культурах усиливается при добавлении сернокислого аммония или дрожжевого экстракта.

*И. Работнова*

Brockmann M. and Stier T. **The use of sodium azide for determining of the fermentation ability of yeast developed under different oxygen tensions.** (Применение Na-азида для определения бродильной способности дрожжей, развивавшихся при разных давлениях кислорода). J. Bact., v. 53, No. 5, pp. 621—630, 1947.

Исследовалась бродильная способность дрожжей, предварительно выращенных при разных условиях аэробности: при продувании воздуха, в колбе с ватной пробкой и в анаэробных условиях в токе $CO_2$. Бродильная способность определялась по потреблению сахара при брожении в токе $CO_2$. При этом сахар потребляется не только на брожение, но и на синтетические процессы, идущие при размножении дрожжей. Размножение дрожжей в токе $CO_2$ зависит от условий, в которых они выращивались. Предварительно аэрируемые дрожжи продолжают некоторое время размножаться. Дрожжи, находившиеся в анаэробных условиях, не размножаются. Таким образом, потребление сахара не дает представления об истинной интенсивности брожения. Синтетические процессы могут быть угнетены азидом натрия. При этом брожение не угнетается. Авторы предполагают, что Na-азид препятствует образованию фосфорных связей, богатых энергией, возникающих при окислительной реакции. При ведении брожения в присутствии Na-азида ни «аэробные», ни «анаэробные» дрожжи не размножаются. Анаэробные дрожжи сбраживают в 2—3 раза больше сахара, чем без Na-азида. Если в присутствии Na-азида фосфорные связи не накапливаются и не тормозят потребления сахара, то бродильная способность в этих условиях может быть выявлена в полной мере. Таким образом, для определения бродильной способности дрожжей предлагается определять потребление сахара культурой в анаэробных условиях (атмосфера $CO_2$) в присутствии азида натрия.

*И. Работнова*

# КРИТИКА И БИБЛИОГРАФИЯ

Кузин А. М. **Химия и биохимия патогенных микробов.** Стр. 276. Медгиз. Москва, 1946.

Книга проф. Кузина имеет целью дать советскому читателю краткий обзор современного состояния биохимии микробов. Такая монография впервые появляется на русском языке. Она отвечает назревшей потребности многочисленных работников в области микробиологии и является полезным вкладом в нашу микробиологическую литературу. Бесспорными достоинствами этой книги являются: 1) краткость и насыщенность конкретными данными; 2) критический отбор принципиально наиболее важных фактов и теоретических воззрений; 3) ясное изложение материала. Литературные указатели в конце каждой главы (с учетом новейших работ приблизительно до 1944 г.) дают читателю возможность ориентироваться в важнейших оригинальных исследованиях. Ввиду безусловного успеха, который будет иметь книга проф. Кузина, уместным является остановиться более подробно на некоторых, с точки зрения рецензента, ее недостатках, имеющих принципиальное значение.

1. Прежде всего, о самом названии книги и о предмете биохимии. Название «Химия и биохимия патогенных микробов» дает повод думать, что «химия микробов» и «биохимия микробов» — две различные области. В действительности в таком двойном названии нет необходимости. Биохимия — наука о закономерностях химических процессов в живом организме, т. е. в организме, развивающемся и находящемся в непрерывном обмене с окружающей средой. Поэтому биологическую химию нельзя оторвать от физиологии, а необходимо, наоборот, где только возможно, при помощи физиологии глубже освещать особенности химических процессов живой клетки. Автор рецензируемой книги, насколько можно судить из «Введения» и из самого содержания книги, придерживается более узкого понимания предмета биохимии, как науки о химическом составе веществ живых организмов, их свойствах, превращениях и взаимоотношениях. Таким образом, исключается физиологический аспект биохимических проблем и отрезается путь для более глубокого раскрытия специфичности химических процессов живого организма. Отрыв биохимии от физиологии является, по нашему мнению, недостатком общего построения книги, определившим некоторые частные моменты, о которых речь будет ниже.

2. Другим недостатком книги проф. Кузина является полный отрыв биохимии от морфологии бактериальной клетки и ее цитологии. Нельзя согласиться с указанием автора на «почти полное отсутствие морфологической дифференцировки» (стр. 5) у бактерий. Для читателя, знакомящегося с биохимией бактериальной клетки, важно знать не только средний химический состав клетки вообще, но особенности химической структуры ее отдельных компонентов — протопласта, жгутиков, спор, разного типа оболочек, углеводных и пептидных капсул, внутриплазменных включений, которые придают определенным группам бактерий резко очерченную биохимически морфологическую индивидуальность. Все эти вопросы представляют необъятной важности теоретический и практический интерес, ибо с морфолого-цитологическими структурами микробной клетки связаны ее антигенные свойства и протекание иммунохимических феноменов. Кроме прямых, визуальных методов (обычной и электронной микроскопии), почетное место в исследовании тонкой цитологической структуры бактериальной клетки получили в настоящее время косвенные биохимические методы (действие антисептиков, энзимов, антител, фагов). Все это лишний раз свидетельствует о том, что биохимические процессы живой клетки могут быть поняты только в свете внутриклеточной физиологической динамики и микроскопической и субмикроскопической клеточной топографии. Повидимому, связь между морфогенетическими и биохимическими процессами простирает свои корни в глубь материи, в область конфигурации молекул и мицелл. Современные исследования о форме белковых молекул и мицелл являются по существу морфологическим принципом, который на наших глазах проникает в область биохимии.

3. Третьей слабой стороной труда проф. Кузина является отсутствие в выборе и трактовке материала сравнительно-биохимического рассмотрения проблем. Ведь задача книги заключается в освещении биохимии патогенных микробов. Спрашивается, можно ли характеризовать особенности патогенных микробов без сравнения их с непатогенными. Вопрос об особенностях патогенных микробов остается для читателя весьма неясным, так как преобладающая часть материала, представленная в книге, одинаково характеризует как патогенных, так и непатогенных бактерий.

Указанные моменты обусловили некоторые частные неудачные формулировки и недостатки, перечисление которых удобно проводить по отдельным главам.

В главе I «Общая характеристика «живого вещества» патогенных микробов» автор совершенно обходит вопрос о том, каковы химические особенности патогенных бактерий, отличающие их от непатогенных. Не разбирается также вопрос о том, каковы биохимические отличия бактерий от других, более высоко организованных существ. Отмечая, что около 80% живого веса патогенных микробов приходится на воду, автор делает следующее заключение: «Такое высокое содержание воды, несомненно, стоит в тесной связи с интенсивностью обмена, интенсивностью процессов метаболизма, столь характерных для бактерийных тел» (стр. 9). Заключение произвольное и неверное. Неправильность его тотчас же становится очевидной при сравнительно-биохимическом рассмотрении вопроса. Многие растения (в том числе пшеница, овес) содержат столько же и еще больше воды, между тем интенсивность их процессов метаболизма несравнимо ниже, чем у бактерий. Аналогичные примеры могут быть приведены и из мира животных. Поэтому не имеется оснований связывать высокую интенсивность обмена у бактериальных клеток с высоким содержанием в них воды. Основной, характерной особенностью биохимического состава бактерий является не высокое содержание воды, а белков, в частности нуклеопротеидов, и оно, повидимому, обусловливает высокую интенсивность метаболизма бактериальной клетки.

Глава II посвящена белковым веществам патогенных микробов. Здесь также некоторые вопросы выиграли бы в ясности при сравнительно-биохимической трактовке. Например, автор указывает, что «как правило, около 50% сухого вещества патогенных микроорганизмов приходится на долю белка» (стр. 14). Остается неизвестным: много ли это или мало? Чтобы ответить на последний вопрос, требуется сравнить содержание белков у бактерий и других организмов.

Наименование нуклеиновых кислот по топографическому принципу на плазмо- и хромонуклеиновые не может считаться удачным как раз по отношению к бактериям; также не имеется оснований противопоставлять в настоящее время растительные нуклеиновые кислоты животным. Как растительная, так и животная клетка может содержать наряду с рибонуклеиновыми дезоксирибонуклеиновые кислоты. Поэтому формулировку автора, что присутствие тимина и отсутствие урацила в нуклеиновой кислоте туберкулезных бацилл сближают ее с нуклеиновыми кислотами животного организма (стр. 27), нельзя не признать анахронизмом. Достойно сожаления, что автором не использованы и не упоминаются выдающиеся работы Белозерского, советского исследователя нуклеиновых кислот бактерий, в которых важные вопросы нуклеопротеидного состава бактерий рассматриваются в аспекте сравнительной биохимии и эволюционной теории.

Недостаточно осторожным представляется, по нашему мнению, взгляд автора о неспособности бактерий усваивать очищенные нативные белки (стр. 37). Опыты, на которые при этом ссылаются, относятся все, если можно так выразиться, к довитаминному периоду развития микробиологии, когда роль ростовых веществ почти не учитывалась. Против всех этих опытов можно возразить, что вместе с очищением белковых препаратов из них вымывались некоторые ростовые вещества, необходимые для развития бактерий.

Глава III «Углеводы патогенных микробов» содержит наряду с обычными данными, имеющимися во всех учебниках, интересный, с химической точки зрения, раздел о специфических полисахаридах бактерий. Может быть, здесь было бы уместно упомянуть о локализации специфических полисахаридов на поверхности клеточных оболочек и в капсулах бактерий. Такая локализация стоит, повидимому, в тесной связи с физиологической ролью специфических полисахаридов, как антигенов. Следовало бы упомянуть и о пирогенах бактериального происхождения, относящихся, по имеющимся данным, к углеводам.

Глава IV посвящена липоидам патогенных микробов, а следующая за ней пятая глава — минеральному составу патогенных микробов. Здесь же трактуются вопросы минерального питания бактерий и роль в процессах питания отдельных элементов.

Глава V. Необычайно малый объем пятой главы (3 страницы) свидетельствует о довольно еще примитивном состоянии наших знаний о минеральном составе патогенных микробов.

Глава VI «Ростовые факторы патогенных микробов» составлена сравнительно более подробно. Но и здесь ощущается отрыв от физиологии и цитологии. Совершенно обойдена молчанием «конкурентная теория» Вудса и Филдса, объясняющая действие некоторых хемотерапевтических препаратов тем, что, имея аналогичную структуру с важными для жизнедеятельности бактериальной клетки ростовыми веществами, они конкурируют с ними, замещают их и блокируют клетку от действия этих замещенных ростовых веществ.

В настоящее время эта теория служит одним из руководящих принципов в исканиях новых хемотерапевтических средств и потому заслуживает в монографии по биохимии микробов наиболее подробного изложения.

В современных исследованиях о действии ростовых веществ на микробную клетку оригинальное место занимают работы М. Н. Мейселя. Они устанавливают действие гипо- и авитаминозов не только на физиологические отправления клетки, но и на ее внутреннюю цитологическую структуру. Хотя эти исследования не относятся непо-

средственно к патогенным бактериям, общебиологическое значение их и научно-практические перспективы настолько значительны, что они должны были быть отражены в монографии.

Глава VII посвящена ферментам патогенных бактерий. После характеристики отдельных групп ферментов из гидролаз и десмолаз автор помещает еще особый раздел: «другие ферменты патогенных микробов» (стр. 183). Здесь приводятся отрывочные данные о некоторых ферментах, которые, с точки зрения рецензента, было бы правильнее поместить в одну из предыдущих групп: карбоксилазу — отнести к десмолазам, аспартазу — к амидазам, фосфореазы — к фосфатазам, ферменты, гидролизирующие специфические полисахариды микробов,— к карбогидразам.

Было бы правильнее амидазы характеризовать не как ферменты, гидролизирующие амиды кислот (стр. 156), но и аминокислоты, как это общепринято.

Несколько неосторожным является утверждение, что, несмотря на несомненное наличие у патогенных микробов фосфатаз, последние до настоящего времени не обнаружены (стр. 162).

Ничем не оправдано полное отсутствие отчетливых указаний на синтетическое действие гидролаз. В характеристиках соответствующих ферментов подчеркивается исключительно их гидролитическая функция (стр. 156, 162, 164, 165) за исключением параграфа об эстеразах, где два раза встречается слово «синтез» (стр. 160 и 162). Нет оснований обходить вопрос об обратимости действия ферментов и роли их в синтетических процессах клетки. Наоборот, эти вопросы заслуживают подробного изложения; в частности, должны быть подчеркнуты оригинальные исследования в этой области А. И. Опарина.

В разделе, посвященном аэробному и анаэробному дыханию и механизму окислительно-восстановительных процессов в живой клетке, совершенно не нашлось места для указания на заслуги русских ученых в разработке этих проблем: А. Н. Баха, В. И. Палладина, а также на оригинальную теорию биоэнергетических процессов клетки и дыхания В. О. Таусссна.

Глава VIII трактует о химии вирусов. Здесь, на наш взгляд, не подчеркнуто принципиальное различие между растительными и животными вирусами, выражающееся в том, что первые по химическому составу принадлежат к простым нуклеопротеидам, тогда как вторые — к липонуклеопротеидам. Повидимому, более сложная химическая природа патогенных для животных вирусных липопротеидов связана и с более сложной их морфологической структурой. Таким образом, намечается возможность говорить об эволюции вирусов.

Глава IX «Иммунохимия» богата фактическими данными новейших достижений и выделяется ясностью изложения. К сожалению, трактовка материала чисто биохимическая, тогда как особенно в иммунологических феноменах большой интерес представляет связь специфических химических структур с определенной архитектурой микробной клетки. Надо надеяться, что в новом издании книги эти интересные аспекты иммунохимического проникновения в тонкую структуру бактериальной клетки найдут свое отражение.

Глава X посвящена антибактериальным веществам микроорганизмов (антибиотикам). Выбор рассматриваемых в ней антибиотиков (пенициллин, грамицидин, проактиномицин, аспергиллин, клавиформин) несколько случаен. Последние два имеют малое практическое значение, тогда как весьма важный стрептомицин в перечне отсутствует. Материалы этой главы к моменту выхода в свет книги уже устарели.

В конце книги автор дает небольшое (на трех страницах) «Заключение», в котором очерчиваются широкие перспективы современной биологической химии микробов и микробиологии. Попытка осветить основные направления и узловые проблемы будущего развития науки, предпринятая крупным специалистом данной области, всегда представляет несомненный интерес. Жаль, что эта часть не расширена.

В заключение хочется еще раз подчеркнуть, что книга проф. Кузина представляет ценное пособие для микробиологов, врачей-инфекционистов и биологов. Остается поблагодарить автора за своевременный и полезный труд.

*Д. М. Новогрудский*

# ХРОНИКА

● В конце 1947 года Президиумом АН СССР была присуждена премия имени академика В. Р. Вильямса доктору биологических наук Е. Н. Мишустину за монографию: «Эколого-географическая изменчивость почвенных бактерий»; в монографии изложены результаты исследований, выполненных в Институте микробиологии Академии Наук СССР.

Эта премия присуждается один раз в три года за лучшие работы в области почвенно-агрономических наук.

● 29 января 1948 г. факультет естественных наук Карлова Университета (Прага) в связи с празднованием юбилея 600-летия Университета единогласно постановил присвоить звание почетного доктора естественных наук Университета академику Борису Лаврентьевичу Исаченко.

В своем обращении к Б. Л. Исаченко Университет отметил его заслуги в области общей микробиологии и подчеркнул особое удовлетворение по поводу присвоения почетного звания выдающемуся советскому ученому.

● В 1947 г. сотрудниками Института Микробиологии АН СССР было закончено большое число работ на соискание ученых степеней доктора и кандидата наук.

Диссертации на соискание степени доктора биологических наук защитили: А. Е. Крисс на тему: «Бактериофаг как двухкомпонентная система» и М. Н. Мейсель на тему: «Биологические регуляторы строения и функции микробной клетки».

Успешно закончив аспирантуру, кандидатские диссертации защитили: М. Г. Еникеева на тему: «Влажность почвы и деятельность микроорганизмов», Л. А. Кузюрина — «Приспособление уробактерий к щелочным условиям среды», Л. К. Осницкая: «Разрушение нафтеновых кислот и нафтеновых углеводородов микроорганизмами», М. Д. Чумак — «Биология ацетоно-этиловых бактерий», также защитили кандидатские диссертации научные сотрудники: С. З. Броцкая на тему: «Термофильные протеолитические бактерии и сохранение их ферментативной активности» и Н. Б. Заварзина — «Действие некоторых углеводородов на микробную клетку».

# ЗОЛОТЫЕ МЕДАЛИ АКАДЕМИИ НАУК СССР

(по Отделению биологических наук)

Золотая медаль им. И. И. Мечникова учреждена Советом Министров СССР 14 мая 1945 г. в связи со столетием со дня рождения крупнейшего деятеля русской микробиологии ученого И. И. Мечникова. Медаль присуждается 16 мая ежегодно советским и зарубежным ученым, зарекомендовавшим себя выдающимися научными трудами в области микробиологии, иммунологии, эпидемиологии и лечения инфекционных болезней и крупными научными достижениями в области биологии.

Медаль впервые присуждена за 1946 г. академику Л. А. Орбели.

*Лицевая сторона*

*Оборотная сторона*

## О ЗОЛОТОЙ МЕДАЛИ И ПРЕМИЯХ ИМЕНИ И. И. МЕЧНИКОВА

Золотая медаль и 2 премии (одна в 50 000 р., другая в 25 000 р.) имени И. И. Мечникова присуждаются Президиумом Академии Наук СССР ежегодно за выдающиеся научные труды в области микробиологии, иммунологии, эпидемиологии и лечения инфекционных болезней и крупные научные достижения в области биологии.

Золотая медаль имени И. И. Мечникова присуждается советским и зарубежным ученым за труды и открытия, относящиеся к 5-летнему периоду, предшествующему году присуждения, имеющие крупное научное, теоретическое или практическое, профилактическое или терапевтическое значение.

Золотой медали имени И. И. Мечникова могут быть удостоены лишь отдельные лица персонально.

Премии им. И. И. Мечникова присуждаются за законченные оригинальные работы, содержащие новые данные или обобщения, а также за открытия и новые методы, имеющие крупное научное, теоретическое или практическое, профилактическое или терапевтическое значение.

На соискание премий им. И. И. Мечникова могут представляться как неопубликованные работы, так и опубликованные в год, предшествующий присуждению. Открытия и методы практического, профилактического и терапевтического характера могут представляться на соискание премий лишь при условии, что они уже введены и апробированы в производственной и клинической практике в год, предшествующий присуждению.

Кандидаты на соискание золотой медали и премий имени И. И. Мечникова могут выдвигаться как самими претендентами на нее, так и научными обществами, научно-исследовательскими институтами, высшими учебными заведениями, ведомствами, общественными организациями и отдельными лицами.

При этом должны быть представлены научные труды кандидатов в трех экземплярах и краткие биографические сведения о кандидатах.

Работы на соискание премий им. И. И. Мечникова представляются в Отделение биологических наук Академии Наук СССР (Москва, Б. Калужская, 33) с надписью: «На соискание премии им. И. И. Мечникова» не позднее 1 января года присуждения премии.

Однако все работы, полученные после закрытия очередного конкурса, будут включены на соискание премий в следующем году.

# СОДЕРЖАНИЕ

Д. М. Новогрудский. Об одном проявлении антимикробных свойств почвы 193
Е. Н. Мишустин. О роли спороносных бактерий в почвенных процессах 201
М. В. Федоров. О значении водорода, непосредственно связанного с углеродным атомом, в фиксации молекулярного азота азотобактером . . . . . 208
А. А. Имшенецкий. Об артефактах, принятых за ядра у бактерий. . . . . 218
М. А. Пешков и Е. И. Нехотенова. Цитологические особенности Corynebacterium diphtheriae Park Williams № 8 при росте на бульоне . . 229
А. Г. Родина. Бактерии как пища для пресноводных моллюсков . . . . . 232
А. Е. Крисс и Е. А. Рукина. О природе бактериофага. III. Роль защитных коллоидов в сохранении устойчивости бактериофага при денатурирующих воздействиях . . . . . 240
Н. А. Шишелова. Роль протопектиназы в инфекционном процессе у растений . . . . . 252
Н. В. Крупин. Влияние грамицидина С на морфологию и физиологию микробов. I. Влияние грамицидина С на морфологию стафилококков и картофельной палочки . . . . . 263
В. Л. Рыжков и В. А. Смирнова. Действие ионов магния и акридиновых препаратов на накопление вирусного белка мозаичной болезни табака 267
С. В. Горюнова. Растворенные органические вещества в открытых водоемах 271
Н. Ф. Гамалея . . . . . 282
Рефераты . . . . . 283
Критика и библиография . . . . . 284
Хроника . . . . . 287

Подписано к печ. 21. V. 1948 г. А 04097 Уч.-изд. л. 9,6
Тираж 3300 экз. Заказ № 628 6 печ. л. + 2 вклейки

2-я тип. Издательства Академии Наук СССР. Москва, Шубинский пер., д. 10

Цена 9 р.

## НА СКЛАДАХ И В МАГАЗИНАХ „АКАДЕМКНИГА“
*имеются в продаже*
**отдельные номера журналов прошлых лет:**

1. ИЗВЕСТИЯ АН, СЕРИЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ

| | | | |
|---|---|---|---|
| за 1943 г., №№ 2, 3, 6 | цена номера | 9 | р. |
| » 1945 г., №№ 2, 3, 4, 6 | » » | 9 | р. |
| » 1946 г., №№ 2—3, 4, 5, 6 | » » | 12 | р. |
| » 1947 г., №№ 2, 3, 4, 5 | » » | 12 | р. |

2. ЖУРНАЛ ОБЩЕЙ БИОЛОГИИ

| | | | |
|---|---|---|---|
| за 1943 г., т. 4, №№ 9, 10 | цена номера | 9 | р. |
| » 1945 г., т. 6, №№ 4, 6 | » » | 9 | р. |
| » 1946 г., т. 7, №№ 4, 5, 6 | » » | 7 | р. 50 к. |
| » 1947 г., т. 8, №№ 1, 3, 4,5 | » » | 7 | р. 50 к. |

3. УСПЕХИ СОВРЕМЕННОЙ БИОЛОГИИ

| | | | |
|---|---|---|---|
| за 1945 г., т. 19—20, №№ 3, 5 | цена номера | 8 | р. |
| » 1946 г., т. 21—22, №№ 2, 3, 4, 5, 6 | » » | 10 | р. |
| » 1947 г., т. 23—24, №№ 1, 4, 5, 6 | » » | 10 | р. |

4. БОТАНИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

| | | | |
|---|---|---|---|
| за 1941 г., т. 26, №№ 2—3 | цена номера | 6 | р. |
| » 1944 г., т. 29, № 5 | » » | 6 | р. |
| » 1945 г.. т. 30, №№ 1, 2, 3, 4, 5, 6 | » » | 6 | р. |
| » 1946 г,, т. 31, №№ 6 | » » | 4 | р. 50 к. |
| » 1947 г., т. 32, №№ 1, 2, 4, 5 | » » | 4 | р. 50 к. |

5. СОВЕТСКАЯ БОТАНИКА

| | | | |
|---|---|---|---|
| за 1936 г., №№ 4, 5, 6 | цена номера | 3 | р. 50 к. |
| » 1937 г., №№ 1, 5 | » » | 3 | р. 50 к. |
| » 1941 г., №№ 4, 5—6 | » » | 8 | р. |
| » 1945 г., т. 13, №№ 5, 6 | » » | 6 | р. |
| » 1946 г., т. 14, №№ 4, 5, 6 | » » | 6 | р. |
| » 1947 г., т. 15, №№ 1, 2, 3, 4 | » » | 6 | р. |

6. ЗООЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

| | | | |
|---|---|---|---|
| за 1943 г., т. 22, №№ 5 | цена номера | 8 | р. |
| » 1944 г., т. 23, № 6 | » » | 8 | р. |
| » 1945 г., т. 24, № 6 | » » | 8 | р. |
| » 1946 г., т. 25, № 4, 5, 6 | » » | 9 | р. |
| » 1947 г,. т. 27, №№ 3, 4, 5, 6 | » » | 9 | р. |

7. МИКРОБИОЛОГИЯ

| | | | |
|---|---|---|---|
| за 1945 г., т. 14, №№ 4, 5, 6 | цена номера | 8 | р. |
| » 1946 г., т. 15, №№ 3, 4, 5, 6 | » » | 9 | р. |
| » 1947 г., т. 16, №№ 4, 5, 6 | » » | 9 | р. |

8. ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

| | | | |
|---|---|---|---|
| за 1945 г., т. 31, №№ 1—2, 4, 5—6 | цена номера | 8 | р. |
| » 1946 г., т. 32, №№ 2, 3, 4, 5, 6 | » » | 12 | р. |
| » 1947 г., т. 33, №№ 1, 2, 3, 4,5, 6 | » » | 12 | р. |

Иногородные заказы выполняются наложенным платежом Конторой „Академкнига“: Москва, Б. Черкасский пер., 2.

Журналы можно приобретать в магазинах „Академкнига“: Москва, ул. Горького, 6; Ленинград, Литейный пр., 53а; Киев, Владимирская ул., 53; Ташкент, ул. Карла Маркса, 29; Свердловск, ул. Малышева 58.